DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2021.26-38>
УДК: 615.272+616-006

Похідне коричної кислоти зменшує пухлинне зростання за рахунок зниження експресії Hif-1α та пригнічення ефекту Варбурга

Поздняков Д.І., ORCID: 0000-0002-5595-8182, e-mail: fharmklinika_2020@gmail.com
Корянова К.Н., ORCID: 0000-0003-1571-9301, e-mail: ksjukor@gmail.com

П'ятигорський медико-фармацевтичний інститут –
філія Федерального державного бюджетного освітнього закладу вищої освіти
«Волгоградський державний медичний університет»
Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації, м. П'ятигорськ, Росія

Cinnamic acid derivative reduces tumor growth by decreasing Hif-1α expression and suppressing the Warburg effect

Pozdnyakov D.I., ORCID: 0000-0002-5595-8182, e-mail: fharmklinika2020@gmail.com
Koryanova K.N., ORCID: 0000-0003-1571-9301, e-mail: ksjukor@gmail.com

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University
of the Ministry of Health of Russian Federation, Pyatigorsk, Russia

Ключові слова:

пухлинний ріст, ефект Варбурга, гліколіз, Hif-1α, похідні коричної кислоти.

Для кореспонденції:

Поздняков Дмитро Ігорович
П'ятигорський медико-фармацевтичний інститут – філія Федерального державного бюджетного освітнього закладу вищої освіти «Волгоградський державний медичний університет» Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації; пр. Калініна, буд. 11, м. П'ятигорськ, Росія, 357532;
e-mail: fharmklinika_2020@gmail.com

© Поздняков Д.І., Корянова К.Н., 2021

РЕЗЮМЕ

Актуальність. Зростання пухлини характеризується наявністю специфічних особливостей, які можуть бути основою для раціонального лікування. Однією з таких особливостей є парадокс Варбурга, який проявляється у превалюванні гліколітичних реакцій окиснення над аеробним метаболізмом при адекватних внутрішньоклітинних концентраціях кисню.

Мета роботи – в умовах експерименту оцінити можливість корекції метаболічних гліколітичних аномалій пухлинних клітин за допомогою курсової терапії 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричною кислотою.

Матеріали та методи. Дослідження виконано на щурах-самцях лінії Вістар, яким у головний мозок імплантували пухлинні клітини лінії C6-BU-1. Досліджувану сполуку 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричну кислоту і референт – ресвератрол вводили per os у дозах 100 мг/кг і 20 мг/кг відповідно протягом 14 днів з моменту інокуляції пухлини. Після закінчення зазначеного часу щурів декапітували, вилучали пухлинну тканину. Під час роботи визначали обсяг пухлини, активність ана/аеробних реакцій клітинного метаболізму, зміну мітохондріального біогенезу та концентрації Hif-1α.

Результати та їх обговорення. Дослідження показало, що курсове введення ресвератролу та 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричної кислоти сприяло зниженню обсягу пухлини порівняно з нелікованими тваринами на 22,9 % ($p < 0,05$) та на 34,3 % ($p < 0,05$) відповідно. На фоні застосування досліджуваної сполуки відзначено також зменшення вмісту Hif-1α на 27,4 % ($p < 0,05$) відповідно, підвищення активності ензиматичних маркерів мітохондріального біогенезу – сукцинатдегідрогенази та цитохром-с-оксидази на 166,7 % ($p < 0,05$) та 125,0 % ($p < 0,05$). Інтенсивність анаеробних реакцій метаболізму у щурів, які отримували досліджувану сполуку і ресвератрол, була значно нижчою, ніж у нелікованих щурів, тоді як активність аеробних процесів значно зросла.

Висновки. Проведене дослідження показало, що застосування 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричної кислоти сприяє зниженню інтенсивності анаеробного обміну в пухлинних клітинах за рахунок зменшення експресії Hif-1α, що пригнічує зростання пухлини.

Для цитування:

Поздняков Д.І., Корянова К.Н. Похідне коричної кислоти зменшує пухлинне зростання за рахунок зниження експресії Hif-1α та пригнічення ефекту Варбурга. *Український радіологічний та онкологічний журнал*. 2021. Т. 29. № 4. С. 26–38. DOI <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2021.26-38>

Key words:

cancer, Warburg effect, glycolysis, Hif-1 α , cinnamic acid derivatives.

For correspondence:

Pozdnyakov Dmitry Igorevich
Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical
Institute – branch of Volgograd State
Medical University of the Ministry of Health
of Russian Federation;
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532;
e-mail: fharmklinika_2020@gmail.com

© Pozdnyakov D.I., Koryanova K.N., 2021

ABSTRACT

Background. Tumor growth is characterized by the presence of specific features that can be the basis for rational treatment. One of these features is the Warburg paradox, which manifests itself in the prevalence of glycolytic oxidation reactions over aerobic metabolism at adequate intracellular oxygen concentrations.

Purpose. Under experimental conditions, to evaluate the possibility of correcting metabolic glycolytic abnormalities of tumor cells through course therapy with 4-hydroxy-3,5-di-tret butyl cinnamic acid.

Materials and methods. The study was performed on male Wistar rats, in which tumor cells of the C6-BU-1 line were implanted in the brain. The test compound 4-hydroxy-3,5-di-tret butyl cinnamic acid and reference resveratrol were administered per os at doses of 100 mg/kg and 20 mg/kg, respectively, for 14 days from the moment of tumor inoculation. After the specified time, the rats were decapitated, the tumor tissue was extracted. In the course of the work, the volume of the tumor, the activity of anaerobic reactions of cellular metabolism, changes in mitochondrial biogenesis and the concentration of Hif-1 α were determined.

Results. The study showed that the course administration of resveratrol and 4-hydroxy-3,5-di-tret butyl cinnamic acid contributed to a decrease in tumor volume compared to untreated animals by 22.9 % ($p < 0.05$) and 34.3 % ($p < 0.05$), respectively. Also, against the background of the use of the studied compound, there was a decrease in the content of Hif-1 α by 27.4 % ($p < 0.05$), respectively, an increase in the activity of the enzymatic markers of mitochondrial biogenesis – succinate dehydrogenase and cytochrome-c oxidase by 166.7 % ($p < 0.05$) and 125.0 % ($p < 0.05$). The intensity of anaerobic metabolic reactions in rats treated by the test compound and resveratrol was significantly lower than in untreated rats, while the activity of aerobic processes considerably increased.

Conclusion. The study showed that the administration of 4-hydroxy-3,5-di-tret butyl cinnamic acid reduces the intensity of anaerobic metabolism in tumor cells by reducing the expression of Hif-1 α , which in turn suppresses tumor growth.

For citation:

Pozdnyakov DI, Koryanova KN. Cinnamic acid derivative reduces tumor growth by reducing Hif-1 α expression and suppressing the Warburg effect. *Ukrainian journal of radiology and oncology*. 2021;29(4):26–38. DOI: <https://doi.org/10.46879/ukroj.4.2021.26-38>

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами

Стаття є фрагментом планової науково-дослідної роботи П'ятигорського медико-фармацевтичного інституту – філії Федерального державного бюджетного освітнього закладу вищої освіти «Волгоградський державний медичний університет» Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації в рамках науково-дослідної роботи «Вивчення фармакологічної активності природних та напівсинтетичних речовин».

Relationship with academic programs, plans and themes

The article is a fragment of the planned research work of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation within the framework of the research plan «Study of the pharmacological activity of natural and semi-synthetic substances».

ВСТУП

Онкологічні захворювання відрізняються найвищим клінічним, економічним та соціальним тягарем. За даними ВООЗ, щороку діагностують понад 18 млн нових випадків онкопатології, з яких понад 8 млн виявляються летальними. За повідомленнями Disability-Adjusted Life Years (DALYs) рак займає перше місце (244,6 млн DALYs) у світі серед усіх причин смертності та інвалідності, як інфекційного, так і неінфекційного генезу [1, 2]. Агресивне пухлинне зростання має низку специфічних особливостей, які визначають такі високі показники летальності та інвалідизації населення. Однією із цих особливостей є аномальний метаболізм, більш відомий як ефект Варбурга [3].

Характерний метаболічний фенотип пухлинних клітин був відкритий у 1930-х роках Отто Варбургом, який встановив, що метаболізм пухлини характеризується високою швидкістю аеробного гліколізу в присутності оптимальної кількості кисню. Гліколіз (і від-

INTRODUCTION

Oncological diseases are characterized as the highest clinical, economic and social burden. According to the WHO, more than 18 million new cases of oncopathology are diagnosed annually, of which more than 8 million are lethal. According to Disability-Adjusted Life Years (DALYs), cancer ranks first (244.6 million DALYs) in the world among all causes of death and disability, both infectious and non-infectious [1, 2]. Aggressive tumor growth has a number of specific features that determine such high rates of mortality and disability of the population. One of these features is abnormal metabolism, better known as the Warburg effect [3].

The characteristic metabolic phenotype of tumor cells was discovered in the 1930s by Otto Warburg, who found that tumor metabolism is characterized by a high rate of aerobic glycolysis in the presence of an optimal amount of oxygen. Glycolysis (and, accordingly, the Warburg effect), as one of the biochemical pathways of ATP synthesis,

повідно ефект Варбурга), як один з біохімічних шляхів синтезу АТФ, є необхідним процесом у пухлинному зростанні, який забезпечує проліферацію, імунну модифікацію клітин пухлини, енергозабезпечення синтезу одновуглецевих фрагментів, реакцій метилювання та ацетилювання у гліколітичному шляху серин-метіонінового циклу та ангиогенез [4]. Сукупно такі процеси підтримують агресивний пухлинний ріст. Переважання реакцій гліколізу в ракових клітинах пов'язане з активацією кількох ефекторних систем: гіпоксія-індукуючим фактором-1 α (Hif-1 α), фосфогліцерат кіназою 1 типу (PGK1) та Akt. Hif-1 α вважається ключовим активатором гліколізу. Гіперекспресія Hif-1 α сприяє зменшенню активності мітохондрій, що у свою чергу викликає зниження активності піруваткінази і, як наслідок, піруват не включається до циклу трикарбонових кислот. У результаті дані процеси призводять до зменшення інтенсивності окисного фосфорилування та аеробного синтезу АТФ, а також підвищеного вмісту лактату. Також Hif-1 α зменшує мітохондріальний біогенез, експресуючи MAX-зв'язуючий білок-1, який інактивує цитохром-с-оксидазу [5].

Корекція аномального метаболізму та фармакотерапевтичне нівелювання ефекту Варбурга може бути одним із перспективних напрямків протипухлинної терапії [6]. Можливості терапевтичної регуляції аеробно/анаеробних реакцій у пухлинних клітинах в основному зводяться до пригнічення гліколізу, внаслідок чого активуються реакції окисного фосфорилування та пригнічується ріст пухлини [7]. При цьому зниження інтенсивності гліколітичних реакцій може бути досягнуто за рахунок зменшення Hif-1 α -опосередкованих реакцій. Деякі інгібітори Hif-1 α (вориностат, tanespimycin) перебувають у II/III стадії клінічних випробувань [8].

Варто зазначити, що вплив на внутрішньоклітинні метаболічні процеси окиснення макроергічних субстратів характерний не тільки для речовин, одержаних шляхом цілеспрямованого хімічного синтезу. Так, Srivani et al. у 2020 р. було встановлено, що природний антиоксидант ресвератрол зменшує транспорт глюкози в ракові клітини, інгібує експресію Hif-1 α та відновлює аеробний метаболізм [9]. Перспективним об'єктом для вивчення в контексті корекції ефекту Варбурга може бути 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил корична кислота, застосування якої сприяє нормалізації активності комплексів мітохондріального дихального ланцюга та деяких ферментів мітохондріального походження [10].

У зв'язку з цим було проведено **дослідження, метою якого було** експериментальне вивчення можливості корекції метаболічних гліколітичних аномалій пухлинних клітин лінії C6 за допомогою курсової терапії 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричною кислотою.

is a necessary process for tumor growth, which provides proliferation, immune modification of tumor cells, energy supply for the synthesis of one-carbon fragments, methylation and acetylation reactions in the glycolytic pathway of the serine-methionine cycle, and angiogenesis [4]. Together, these processes support aggressive tumor growth. The predominance of glycolysis reactions in cancer cells is associated with the activation of several effector systems: hypoxia-inducing factor-1 α (Hif-1 α), phosphoglycerate kinase 1 type (PGK1) and Akt. Hif-1 α a key activator of glycolysis. Overexpression of Hif-1 α contributes to a decrease of the mitochondria activity, which causes a decrease of the pyruvate kinase activity and, therefore, pyruvate is not included in the tricarboxylic acid cycle. As a result, these processes lead to a decrease in the intensity of oxidative phosphorylation and aerobic synthesis of ATP, as well as an increased content of lactate. Also, Hif-1 α reduces mitochondrial biogenesis by expressing MAX-binding protein-1, which inactivates cytochrome c oxidase [5].

Correction of abnormal metabolism and pharmacotherapeutic elimination of the Warburg effect may be one of the promising areas of anticancer therapy [6]. The possibilities of the therapeutic regulation of aerobic/anaerobic reactions in tumor cells are mainly reduced to the suppression of glycolysis, which result in activation of oxidative phosphorylation reactions and suppression of tumor growth [7]. At the same time, a decrease in the intensity of glycolytic reactions can be achieved by reducing the Hif-1 α -mediated reactions. Some Hif-1 α inhibitors (vorinostat, tanespimycin) are in phases II/III of clinical trials [8]. In addition, it should be mentioned, that the effect of high-energy substrates oxidation on intracellular metabolic processes is characteristic not only of substances obtained by targeted chemical synthesis. Indeed, Srivani et al., found in 2020 that the natural antioxidant resveratrol reduces the transport of glucose into cancer cells, inhibits the expression of Hif-1 α and restores aerobic metabolism [9]. A promising object for study in the context of correcting the Warburg effect may be 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid, the use of which contributes to the normalization of the activity of the mitochondrial respiratory chain complexes and some enzymes of mitochondrial origin [10].

In this regard, **the aim of this work was** to experimentally evaluate the possibility of correcting metabolic glycolytic abnormalities of C6 tumor cells by a 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid course therapy.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні тварини

Робота виконана на 40 щурах-самцях лінії Wistar 6-місячного віку з масою тіла 240 ± 10 г. Тварини були отримані з лабораторії живих систем П'ятигорського медико-фармацевтичного інституту і на час дослідження перебували в контрольованих умовах експериментального віварію: температура повітря $20 \pm 2^\circ\text{C}$, відносна вологість – $65 \pm 5\%$, 12-годинний добовий цикл (12 годин – день, 12 годин – ніч). Щурів розміщували в поліпропіленових клітках по 5 особин із вільним доступом до корму та води. Дизайн дослідження та біомето-

MATERIALS AND METHODS

Experimental animals

The work was carried out on 40 male 6-month-old Wistar with a body weight of 240 ± 10 grams. The animals were obtained from the living systems laboratory of Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute and during the study were kept under controlled conditions of an experimental vivarium: air temperature $20 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity – $65 \pm 5\%$, 12-hour daily cycle (12 hours a day, 12 hours night). The rats were housed in polypropylene cages, 5 individuals in each, with free access to food and water. The study design and bio-methodological techniques

дологічні техніки поводження з тваринами відповідали концепції проведення біологічного експерименту ARRIVE 2.0. та Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, September 22, 2010.

Імплантація ракових клітин

Культура клітин гліоми мозку щурів C6-BU-1 була отримана від Sigma-Aldrich (Німеччина). Імплантацію проводили згідно з такими стереотаксичними координатами: передньо-задній = –3,8 мм, медіально-латеральний = 2,0 мм, дорсально-вентральний = 2,6 мм від брегми, як визначено Paxinos [11]. Щурів анестезували шляхом внутрішньочеревинного введення хлоралгідрату (350 мг/кг), далі депілювали вовняний покрив і розсікали м'які тканини у тім'яній ділянці. Борм проробляли отвір діаметром 0,5 мм і вводили суспензію клітинної культури C6-BU-1 обсягом 0,1 мл. Топографію кісткової тканини відновлювали пастою «Дентин», після чого рану вшивали і тварин залишали під зігріваючою лампою.

Хімічні сполуки

4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил корична кислота (ATACL) була отримана на кафедрі органічної хімії П'ятигорського медико-фармацевтичного інституту під керівництвом професора, доктора фармацевтичних наук Е.Т. Оганесяна. Ідентифікацію сполуки проводили з використанням спектроскопічних методів аналізу (1H ЯМР спектроскопія). Стандартну субстанцію (не менше 98 % чистої речовини) ресвератролу було отримано від Hunan Warrant Pharm. (КНР). Інші хімічні сполуки та реактиви для проведення аналізу були отримані від Sigma-Aldrich (Німеччина), якщо не вказано інше.

Дизайн дослідження

У ході виконання роботи тварини були розподілені на 4 групи по 10 особин у кожній: ХО – хібно оперовані тварини; НК – група негативного контролю із відтвореною патологією, але без фармакологічної підтримки; група тварин, що отримувала ресвератрол у дозі 20 мг/кг – група щурів Resv, перорально [12]; група щурів, якій вводили досліджувану сполуку 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричну кислоту (ATACL) у дозі 100 мг/кг – група тварин «ATACL», перорально. Групі НК вводили еквівалентну кількість 0,9 % розчину натрію хлориду [13]. Введення ресвератролу та сполуки ATACL здійснювали протягом 14 днів з моменту імплантації ракових клітин (щодня, одноразово на добу). Після закінчення зазначеного часу щурів декапітували під хлоралгідратною анестезією, вилучали головний мозок. Далі визначали об'єм пухлини, після чого з досліджуваної пухлинної тканини отримували субклітинну фракцію, в якій оцінювали зміну процесів клітинного дихання, мітохондріального біогенезу та концентрації Hif-1α. Тривалість введення та дози сполук були обрані з урахуванням особливостей пухлинного росту клітин C6-BU-1 та раніше проведених досліджень [13].

Одержання субклітинної фракції

Субклітинну фракцію отримували шляхом градієнтного центрифугування гомогенату пухлинної тканини, яку центрифугували в середовищі 1 ммоль EGTA + + 215 ммоль маніту + 75 ммоль сахарози + 0,1 % розчин БСА + 20 ммоль HEPES при pH 7,2. Гомогенат

for handling the animals were in conformity with the ARRIVE 2.0 biological experiment concept and Directive 2010/63 / EU of the European Parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, September 22, 2010.

Cancer cell implantation

The culture of rat brain glioma cells C6-BU-1 was obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Implantation was performed according to the following stereotaxic coordinates: anteroposterior = –3.8 mm, medial-lateral = 2.0 mm, dorsal-ventral = 2.6 mm from bregma, as defined by Paxinos [11]. The rats were anesthetized by intraperitoneal injection of chloral hydrate (350 mg/kg), then their pelage was depilated and soft tissues in the parietal region were dissected. By means of a drill the holes were made with a diameter of 0.5 mm, in which suspension of the cell culture C6-BU-1 in volume of 0.1 ml was injected. The topography of the bone tissue was restored with the Dentin paste, after which the wounds were sutured and the animals were left under a warming lamp.

Chemical compounds

4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid (ATACL) was obtained at the Department of Organic Chemistry of Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute under the guidance of Professor., Doctor of Pharmacy Oganessian E. T. The identification of the compound was carried out using spectroscopic methods of analysis (1H NMR spectroscopy). The standard substance (no less than 98 % pure substance) of resveratrol was obtained from Hunan Warrant Pharm. (China). The rest of the chemical compounds and reagents for the analysis were obtained from Sigma-Aldrich (Germany) unless a different source is indicated.

Study design

In the course of the work, the animals were divided into 4 groups by of 10 individuals in each: SO – sham-operated animals; NC – negative control group with reproduced pathology, but without pharmacological support; a group of animals that received resveratrol at a dose of 20 mg/kg orally – a group of Resv rats, [12]; the group of rats, which was treated by the studied compound 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid (ATACL) at a dose of 100 mg/kg orally – the group of animals «ATACL». The NC group was treated with an equivalent amount of 0.9 % sodium chloride solution [13]. Resveratrol and ATACL compound were administered for 14 days once daily from the moment of cancer cell implantation. After the specified time, the rats were decapitated under chloral hydrate anesthesia, and the brain was removed. Next, the volume of the tumor was determined, and after that a subcellular fraction was obtained from the studied tumor tissue, in which the changes in the processes of cellular respiration, mitochondrial biogenesis, and the concentration of Hif-1α were assessed. The duration of administration and doses of the compounds were selected with consideration to the peculiarities of tumor growth of C6-BU-1 cells and previous studies data [13]

Obtainment of subcellular fraction

The subcellular fraction was obtained by way of gradient centrifugation of a tumor tissue homogenate, for which it was homogenized in a medium of 1 mmol EGTA + + 215 mmol mannitol + 75 mmol sucrose + 0.1 % BSA solution + 20 mmol HEPES, at pH 7.2. The homogenate was

центрифугували впродовж 2 хв з прискоренням 1100 g. Супернатант переносили в пробірки Еппендорф і на шарувували 10 % розчин перколу. Отриману суміш центрифугували повторно протягом 10 хв з прискоренням 18000 g. Надосадкову рідину відкидали, осад ресуспендували в 1 мл ізолюючого середовища і центрифугували протягом 5 хв при 10 000 g. Супернатант видаляли для проведення аналізу [14].

Визначення об'єму пухлини

Об'єм пухлини визначали онкометрично за зміною обсягу витісненої рідини з установки, що являє собою два сполучені циліндри, один з яких заповнений рідиною до утворення «дзеркала». Другий циліндр має градуйовану шкалу для визначення обсягу. Пухлину вміщували в перший циліндр і фіксували зміну обсягу в другому циліндрі. Об'єм виражали в міліметрах кубічних.

Оцінка зміни клітинного дихання

Респірометричний аналіз проводили на лабораторному респірометрі АКПМ1-01Л (Альфа Бассенс, Росія). Дихальну функцію мітохондрій оцінювали за швидкістю споживання кисню (OCR) у середовищі на тлі введення роз'єднувачів клітинного дихання: олігоміцин 1 мкг/мл; 4-трифторметоксифенілгідразоно малонітрил (FCCP – 1 мкм); ротенон – 1 мкм; азид натрію – 20 ммоль. Були визначені такі параметри: АТФ-генеруюча здатність; максимальний рівень дихання та респіраторної ємності. Активність процесів гліколізу оцінювали при використанні глюкози (15 ммоль/л) як субстрату окиснення, визначали інтенсивність гліколізу, гліколітичну ємність та гліколітичний резерв. Під час аналізу обсяг біопробі становив 275 мкл, мітохондріальні респіраторні роз'єднувачі вводилися обсягом 25 мкл. Споживання кисню визначали у промілі з подальшим перерахунком на концентрацію білка у зразку. Вміст білка визначали методом Бредфорда [15].

Оцінка зміни активності мітохондріального біогенезу

Мітохондріальний біогенез оцінювали за зміною активності сукцинатдегідрогенази (SDH) та цитохром-с-оксидази (COX). Активність цитохром-с-оксидази визначали в мітохондріальній фракції за зміною оптичної щільності середовища реакції окиснення цитохрому С (II) у присутності KCN при 500 нм [16].

Активність сукцинатдегідрогенази оцінювали спектрофотометрично в реакції сукцинат-залежного відновлення дихлорфеноліндофенолу при додаванні в аналізоване середовище ротенону при 600 нм [17]. У ході аналізу було використано стандартні набори реактивів виробництва Abcam.

Визначення концентрації Hif-1α

Вміст Hif-1α оцінювали методом твердофазного імуноферментного аналізу. Аналіз виконаний із застосуванням видоспецифічних реактивів виробництва Cloud clone (США). Проведення аналізу відповідало рекомендаціям виробника. Реєстрацію аналітичного сигналу робили з використанням мікропланшетного ІФА-ридера Infinite F50 (Tecan, Австрія).

Статистичний аналіз

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали із застосуванням програмного пакета

centrifuged for 2 minutes at 1100 g. The supernatant was transferred to Eppendorf tubes and layered with 10 % Percoll solution. The resulting mixture was re-centrifuged for 10 minutes at 18000g. The supernatant was discarded, the pellet was resuspended in 1 ml of isolation medium and centrifuged for 5 minutes at 10,000 g. The supernatant was removed for analysis [14].

Determination of tumor volume

The volume of the tumor was measured oncometrically by the change in the volume of the displaced liquid from the installation, which is represented by two communicating cylinders, one of which is filled by liquid until a «mirror» is formed. The second cylinder is equipped with a graduated scale for determining the volume. The tumor was placed in the first cylinder and the change of volume in the second cylinder was recorded. The volume was expressed in mm³.

Estimating the change in cellular respiration

Respirometry analysis was performed using a laboratory respirometer AKPM1-01L (Alfa Bassens, Russia). Respiratory function of mitochondria was assessed by the oxygen consumption rate (OCR) in the medium against the background of the introduction of cellular respiration uncouplers: oligomycin 1 μg/ml; 4-(trifluoromethoxy) phenyl) hydrazono) malononitrile (FCCP – 1 μm); rotenone – 1 μg/ml; sodium azide – 20 mmol. The following parameters were estimated: ATP-generating capacity; maximum respiration rate and respiratory capacity. The activity of glycolysis processes was assessed using glucose (15 mmol/L) as an oxidation substrate. The intensity of glycolysis, glycolytic capacity and glycolytic reserve were also determined. During the analysis, the volume of the bioassay was 275 μL, mitochondrial respiratory uncouplers were injected in a volume of 25 μL. Oxygen consumption was determined in ppm with subsequent conversion to the protein concentration in the sample. The protein content was determined by the Bradford method [15].

Mitochondrial biogenesis activity evaluation

Mitochondrial biogenesis was assessed by changes in the activity of succinate dehydrogenase (SDH) and cytochrome c oxidase (COX). The activity of cytochrome-c-oxidase was determined in the mitochondrial fraction by the change in the optical density of the medium of the oxidation reaction of cytochrome C (II) in the presence of KCN at 500 nm [16].

The activity of succinate dehydrogenase was assessed spectrophotometrically in the reaction of succinate-dependent reduction of dichlorophenolindophenol when rotenone was added to the analyzed medium at 600 nm [17]. During the analysis, standard kits from Abcam were used.

Determination of Hif-1α concentration

The Hif-1α content was assessed by the enzyme-linked immunosorbent assay. The analysis was performed using species-specific reagents manufactured by Cloud clone (USA). The analysis was in accordance with the manufacturer's recommendations. The analytical signal was recorded using Infinite F50 microplate ELISA reader (Tecan, Austria).

Statistical analysis

The results were statistically processed using the STATISTICA 6.0 software package (StatSoft). The data

STATISTICA 6.0 (StatSoft). Дані виражали як $M \pm SE$ (середнє $\pm$ стандартна похибка середнього). Нормальність розподілу оцінювали за допомогою критерію Шапіро–Вілка, однорідність дисперсії – із застосуванням критерію Левена. Статистичну значущість відмінностей між групами проводили методом однофакторного дисперсійного аналізу з пост-обробкою Ньюмена–Кейлса при критичному рівні значущості $p < 0,05$.

were expressed as $M \pm SEM$ (mean $\pm$ standard error of the mean). The normality of distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test, the uniformity of variance was assessed using the Levene's test. The statistical significance of the differences between the groups was carried out by the method of one-way analysis of variance with post-processing Newman–Keuls test at a critical level of significance $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

RESULTS AND DISCUSSION

Вплив сполуки ATACL та ресвератролу на зміну обсягу пухлини

Під час проведення дослідження було встановлено, що у тварин, які отримували курсову терапію ресвератролом (рис. 1), обсяг пухлини зменшився на 22,9 % ($p < 0,05$) відносно групи щурів НК. Водночас у тварин, що отримували сполуку ATACL, обсяг пухлини був нижчим за аналогічний у НК групи щурів на 34,3 % ($p < 0,05$) і на 14,8 % ($p < 0,05$) у порівнянні з тваринами, яким вводили ресвератрол.

Effect of ATACL and Resveratrol on Tumor Volume Change

In the course of the study, it was found that in animals receiving a course therapy with resveratrol (Fig. 1), the tumor volume decreased by 22.9 % ($p < 0.05$) in relation to the group of NC rats. At the same time, in animals receiving the ATACL compound, the tumor volume was lower than in the NC group of rats by 34.3 % ($p < 0.05$) and by 14.8 % ($p < 0.05$) in comparison with animals treated with resveratrol.

Рис. 1. Вплив сполуки ATACL та ресвератролу на зміну об'єму пухлини
Fig. 1. Effect of ATACL and resveratrol on tumor volume change

Примітка:

- * – статистично значуще щодо тварин групи негативного контролю (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);
- # – статистично значуще щодо групи тварин, які отримували ресвератрол (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$)

Note:

- * – statistically significant relative to the negative control group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);
- # – statistically significant relative to the group of animals receiving resveratrol (Newman–Keuls test, $p < 0.05$)

Вплив сполуки ATACL та ресвератролу на зміну процесів клітинного дихання

Загальний рівень споживання кисню пухлинними клітинами у щурів НК групи був на 64,3 % ($p < 0,05$) нижче за такий у ХО тварин (рис. 2), тоді як на тлі введення ресвератролу та сполуки ATACL даний показник збільшився (по відношенню до НК групи тварин) на 91,4 % ($p < 0,05$) та 120,4 % ($p < 0,05$) відповідно.

Далі в ході оцінки інтенсивності аеробного метаболізму було встановлено, що у НК групи тварин щодо ХО щурів спостерігалось зниження АТФ-генеруючої здатності, максимального рівня дихання і респіраторної ємності на 32,2 % ($p < 0,05$); 37,4 % ($p < 0,05$) та 32,1 % ($p < 0,05$) відповідно (рис. 3). Курсове застосування ресвератролу не вплинуло на зміну АТФ-генеруючої активності, але сприяло збільшенню максимального рівня дихання та респіраторної ємності в порівнянні з

Effect of ATACL and Resveratrol on Changes in Cellular Respiration

The overall level of OCR by tumor cells in the NC group rats was 64.3 % ($p < 0.05$) lower than that in the SO animals (Fig. 2), while against the background of the administration of resveratrol and ATACL compound this indicator increased (in relation to NC group of animals) by 91.4 % ($p < 0.05$) and 120.4 % ($p < 0.05$), respectively.

Further, in the course of assessing the intensity of aerobic metabolism, it was found that in the NC group of animals relative to the SO rats, there was a decrease in ATP-generating capacity, the maximum level of respiration and respiratory capacity by 32.2 % ($p < 0.05$); 37.4 % ($p < 0.05$) and 32.1 % ($p < 0.05$), respectively (Fig. 3). The course use of resveratrol did not have a significant effect on the change in ATP-generating activity, but contributed to an increase in the maximum level of respi-

НК групою тварин на 19,1 % ($p < 0,05$) та 14,7 % ($p < 0,05$) відповідно. При цьому АТФ-генеруюча активність у щурів, що отримували АТАСЛ, була вище, ніж у тварин, яким вводили ресвератрол на 20,7 % ($p < 0,05$).

ration and respiratory capacity in comparison with the NC group of animals by 19.1 % ($p < 0.05$) and 14.7 % ($p < 0.05$), respectively. At the same time, ATP-generating activity in rats treated with ATACL was 20.7 % higher than in animals treated with resveratrol ($p < 0.05$).

Рис. 2. Вплив сполуки АТАСЛ та ресвератролу на зміну загального споживання кисню пухлинними клітинами
Fig. 2. Influence of ATACL and resveratrol compounds on changes in total oxygen consumption by tumor cells

Примітка:

* – статистично значуще щодо тварин групи негативного контролю (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);

– статистично значуще щодо показників хібнооперованих тварин (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$).

Note:

* – statistically significant relative to the negative control group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);

– statistically significant relative to the shamoperated group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$)

Рис. 3. Вплив сполуки АТАСЛ та ресвератролу на зміну активності аеробних процесів клітинного дихання
Fig. 3. Influence of ATACL and resveratrol compounds on changes of the activity of aerobic processes in cellular respiration

Примітка:

* – статистично значуще щодо тварин групи негативного контролю (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);

– статистично значуще щодо показників хібнооперованих тварин (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);

Δ – статистично значуще щодо групи тварин, які отримували ресвератрол (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$).

Note:

* – statistically significant relative to the negative control group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);

– statistically significant relative to the shamoperated group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);

Δ – statistically significant relative to the group of animals receiving resveratrol (Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

На протипагу аеробному метаболізму анаеробні процеси (рис. 4) у НК групи щурів мали більш активний перебіг, про що свідчить підвищення (порівняно з

In contrast to aerobic metabolism, anaerobic processes (Fig. 4) in the NC group of rats proceeded more actively, as evidenced by an increase (in comparison with the

ХО групою) інтенсивності гліколізу в 8,7 рази ($p < 0,05$) та зниження гліколітичної ємності та гліколітичного резерву на 82,0 % ($p < 0,05$) та 78,2 % ($p < 0,05$) відповідно (див. рис. 4). На тлі введення ресвератролу та сполуки ATACL інтенсивність гліколізу зменшилася щодо НК групи тварин на 29,8 % ($p < 0,05$) та 37,5 % ($p < 0,05$) відповідно. До того ж, гліколітична ємність у щурів, що отримували ресвератрол і ATACL, на 65,2 % ($p < 0,05$) і 96,8 % ($p < 0,05$) відповідно була вищою, ніж у НК групи тварин. Гліколітичний резерв на фоні застосування ресвератролу збільшився порівняно з ПК групою тварин на 43,2 % ($p < 0,05$), а з уведенням щурам сполуки ATACL цей показник збільшився на 81,7 % ($p < 0,05$). Варто зазначити, що гліколітичний резерв у тварин, яким вводили ATACL, був вищим за аналогічний у тварин, які отримували ресвератрол, на 26,9 % ($p < 0,05$).

LO group) in the intensity of glycolysis by 8.7 times ($p < 0.05$) and a decrease in glycolytic capacity and glycolytic reserve by 82.0 % ($p < 0.05$) and 78.2 % ($p < 0.05$), respectively (Fig. 4). Against the background of the resveratrol and the ATACL administration, the intensity of glycolysis decreased in relation to the NC group of animals by 29.8 % ($p < 0.05$) and 37.5 % ($p < 0.05$), respectively. At the same time, the glycolytic capacity in rats treated with resveratrol and ATACL was 65.2 % ($p < 0.05$) and 96.8 % ($p < 0.05$) higher than in the NC group of animals. The glycolytic reserve against the background of the use of resveratrol increased in comparison with the NC group of animals by 43.2 % ($p < 0.05$), and when the ATACL compound was administered to rats, this indicator increased by 81.7 % ($p < 0.05$). It is worth noting that the glycolytic reserve in animals treated with ATACL was 26.9 % ($p < 0.05$) higher than in animals treated with resveratrol.

Рис. 4. Вплив сполуки ATACL та ресвератролу на зміну активності анаеробних процесів клітинного дихання
Fig. 4. Influence of ATACL and resveratrol on changes in the activity of anaerobic processes of cellular respiration

Примітка:

- * – статистично значуще щодо тварин групи негативного контролю (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);
- # – статистично значуще щодо показників хібнооперованих тварин (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);
- Δ – статистично значуще щодо групи тварин, які отримували ресвератрол (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$).

Note:

- * – statistically significant relative to the negative control group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);
- # – statistically significant relative to the shamoperated group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);
- Δ – statistically significant relative to the group of animals receiving resveratrol (Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

Вплив сполуки ATACL та ресвератролу на зміну мітохондріального біогенезу

Протягом проведення даного експериментального блоку було встановлено, що у щурів НК групи активність SDH і COX (рис. 5) була нижчою за аналогічні у ХО щурів на 70,0 % ($p < 0,05$) і 71,2 % ($p < 0,05$) відповідно. При застосуванні ресвератролу активність SDH збільшилася щодо НК групи щурів на 83,3 % ($p < 0,05$), а COX – на 75,0 % ($p < 0,05$). На тлі введення тваринам сполуки ATACL активність SDH і COX була вищою за таку у НК групи щурів на 166,7 % ($p < 0,05$) і 125,0 % ($p < 0,05$). Також у щурів, які отримували ATACL, активність мітохондріальних ферментів SDH і COX перевищувала аналогічні показники у тварин, яким вводили ресвератрол, на 45,5 % ($p < 0,05$) та 28,6 % ($p < 0,05$).

Effect of ATACL and Resveratrol on Changes in Mitochondrial Biogenesis

In the course of this experimental block, it was found that in the rats of NC group the SDH and COX activity (Fig. 5) was 70.0 % ($p < 0.05$) and 71.2 % ($p < 0.05$) respectively lower than in SO rats. When using resveratrol, the SDH activity increased compared to the NC group of rats by 83.3 % ($p < 0.05$), and COX – by 75.0 % ($p < 0.05$). Against the background of the administration of the ATACL compound to the animals, the SDH and COX activity was by 166.7 % ($p < 0.05$) and 125.0 % ($p < 0.05$) higher than that in the NC group of rats. Also, in rats treated with ATACL, the activity of mitochondrial enzymes SDH and COX exceeded those in animals treated with resveratrol by 45.5 % ($p < 0.05$) and 28.6 % ($p < 0.05$).

Рис. 5. Дія сполуки ATACL та ресвератролу на зміну активності сукцинатдегідрогенази та цитохром-с-оксидази
Fig. 5. Influence of ATACL and resveratrol compounds on changes in succinate dehydrogenase and cytochrome c oxidase activities

Примітка:

- * – статистично значуще щодо тварин групи негативного контролю (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);
- # – статистично значуще щодо показників хібнооперованих тварин (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);
- Δ – статистично значуще щодо групи тварин, які отримували ресвератрол (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$).

Note:

- * – statistically significant relative to the negative control group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);
- # – statistically significant relative to the shamoperated group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);
- Δ – statistically significant relative to the group of animals receiving resveratrol (Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

Дія сполуки ATACL та ресвератролу на зміну концентрації Hif-1α

У НК групи тварин концентрація Hif-1α (рис. 6) перевищувала аналогічну у групі ХО щурів у 3,8 рази ($p < 0,05$). На тлі введення тваринам ресвератролу та ATACL відзначено зменшення вмісту Hif-1α відносно НК групи тварин на 19,9 % ($p < 0,05$) та 27,4 % ($p < 0,05$) відповідно. При цьому концентрація Hif-1α у тварин, що отримували ATACL, була на 32,8 % ($p < 0,05$) нижче, ніж у щурів, яким вводили ресвератрол (рис. 6).

Effect of ATACL and Resveratrol on Changes of Hif-1α Concentration

In the NC group of animals, the concentration of Hif-1α (Fig. 6) exceeded that in SO rats by 3.8 times ($p < 0.05$). Against the background of the resveratrol and ATACL administration to animals, a decrease in the content of Hif-1α in relation to the NC group of animals by 19.9% ($p < 0.05$) and 27.4 % ($p < 0.05$), respectively was noted. At the same time, the concentration of Hif-1α in animals treated with ATACL was 32.8 % ($p < 0.05$) lower than in rats injected with resveratrol (Fig. 6).

Рис. 6. Дія сполуки ATACL та ресвератролу на зміну концентрації Hif-1α
Fig. 6. Effect of ATACL compound and resveratrol on the change in Hif-1α concentration

Примітка:

- * – статистично значуще щодо тварин групи негативного контролю (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);
- # – статистично значуще щодо показників хібнооперованих тварин (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$);
- Δ – статистично значуще щодо групи тварин, які отримували ресвератрол (тест Ньюмена–Кейлса, $p < 0,05$).

Note:

- * – statistically significant relative to the negative control group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);
- # – statistically significant relative to the shamoperated group of animals (Newman–Keuls test, $p < 0.05$);
- Δ – statistically significant relative to the group of animals receiving resveratrol (Newman–Keuls test, $p < 0.05$).

Обговорення результатів

Онкологічні захворювання, залишаючись найбільш значущою медико-соціально-економічною проблемою, потребують своєчасної та адекватної терапії. Сьогодні відомо безліч лікарських препаратів, що пригнічують ріст пухлини. Вони, як правило, належать до неспецифічних засобів, що пригнічують ріст та проліферацію клітин [18]. Крім того, активно ведуться розробки в галузі таргетної терапії на основі специфічних антитіл та їх кон'югатів із лікарськими препаратами [19]. Одним із перспективних напрямків розробки протипухлинних засобів може бути цілеспрямована корекція аномальних реакцій пухлинного метаболізму, більш відомого як ефект Варбурга. Зазвичай пухлинні клітини покривають свої потреби в енергозабезпеченні за рахунок реакції синтезу АТФ анаеробним шляхом, у тому числі й за достатньої кількості кисню у клітині. В результаті переважання реакцій гліколізу над анаеробними процесами утворюється значна кількість інтермедіатів метаболізму кислого характеру, які посилюють агресивне пухлинне зростання за рахунок зміни мікрооточення пухлини. Крім того, гліколіз – процес, що відбувається в цитозолі клітини при каталізі ряду специфічних ферментів, має перевагу перед реакцією окисного фосфорильовування в плані швидкості синтезу АТФ, що забезпечує необхідну інтенсивність росту пухлинних клітин. Реакції анаеробного обміну та метаболічний перехід від аеробного на анаеробний обмін регулюються безліччю внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, таких як AMPK-PDHc [20] та m-TOR/PI3K/Akt [21]. Однак провідним механізмом регулювання анаеробних процесів у пухлинних клітинах є Hif-1 α . Hif-1 α становить висококонсервативний білок масою 120–130 кДа, надекспресований у більшості пухлинних клітин. У клітинах пухлини Hif-1 α сприяє активації транспортерів глюкози GLUT 1 і 3, лактатдегідрогенази А, PDK1, що обмежує синтез ацетил-КоА, пригнічує реакції циклу трикарбонових кислот та знижує споживання кисню. Так само HIF-1 α впливає на пентозофосфатний шлях, який перетворює проміжні продукти гліколізу на 5-фосфорибозу – необхідного субстрату для синтезу нуклеотиду [22]. Таким чином, можна припустити, що Hif-1 α і пов'язаний з ним анаеробний гліколіз у ракових клітинах можуть бути перспективною мішенню протипухлинної терапії [23]. Проведене дослідження показало, що застосування сполуки ATACL і референту (ресвератролу) сприяло зниженню концентрації Hif-1 α у пухлинних клітинах, причому ефект від застосування досліджуваної сполуки перевершував ефект референту. Пригнічення експресії Hif-1 α на тлі введення тваринам сполуки ATACL, імовірно, пов'язане із впливом даної речовини, як представника низки похідних коричних кислот, на сигнальний шлях PI3K/Akt [24, 25]. Сигнальний шлях PI3K/Akt може регулювати деградацію Hif-1 α за допомогою різних механізмів. Один механізм опосередковується кіназою-3 глікогенсинтази (GSK-3), другий механізм пов'язаний з активацією FOXO4 [26]. GSK-3 фосфорилує серин 551 (Ser551), треонін 555 (Thr555) та серин 589 (Ser589) Hif-1 α , після чого він убіквітинується й руйнується [27]. FOXO4 також може індукувати убіквітинування та деградацію Hif-1 α [28]. Подальші зміни внутрішньоклітинного метаболізму пухлинних клітин, що спостерігалися при застосуванні досліджуваної речовини та референту, опосередковуються пригніченням Hif-1 α . Так, на тлі введення тваринам ATACL та ресвератролу відмічено збільшення мітохондріального

Discussion

Oncological diseases, while remaining the most significant medical, socio-economic problem, require timely and adequate therapy. Today there are many drugs that suppress tumor growth. As a rule, they are nonspecific drugs [17] that suppress the growth and proliferation of cells [18]. In addition, there are active developments in the field of targeted therapy based on specific antibodies and their conjugates with medicines [19]. Targeted correction of abnormal reactions of tumor metabolism, better known as the Warburg effect, may be one of the promising directions in the development of anticancer agents. It is known that tumor cells cover their needs for energy supply through the reaction of ATP synthesis by the anaerobic pathway, including the cases when there's sufficient amount of oxygen in the cell. As a result of the predominance of glycolysis reactions over anaerobic processes, a significant number of acidic metabolic intermediates are formed, which enhance aggressive tumor growth due to changes in the tumor microenvironment.

In addition, glycolysis, a process that occurs in the cytosol of a cell during catalysis of a number of specific enzymes, has an advantage over oxidative phosphorylation reactions in terms of the rate of ATP synthesis, which provides the necessary growth rate for tumor cells. Anaerobic metabolic reactions and metabolic transition from aerobic to anaerobic metabolism are regulated by a variety of intracellular signaling pathways, such as AMPK-PDHc [20] and m-TOR / PI3K / Akt [21]. But the leading mechanism of regulation of anaerobic processes in tumor cells is Hif-1 α . Hif-1 α is a highly conserved 120–130 kDa protein overexpressed in most tumor cells. In tumor cells, Hif-1 α contributes to the activation of glucose transporters GLUT 1 and 3, lactate dehydrogenase A, PDK1, which limits the synthesis of acetyl-CoA, suppresses the reactions of the tricarboxylic acid cycle and reduces oxygen consumption. Also, HIF-1 α affects the pentose phosphate pathway, which converts intermediate products of glycolysis into 5-phosphoribose, a necessary substrate for nucleotide synthesis [22]. Thus, it can be assumed that Hif-1 α and the associated anaerobic glycolysis in cancer cells may be a promising target for anti-tumor therapy [23]. The study showed that the use of the ATACL compound and the referent (resveratrol) contributed to a decrease in the concentration of Hif-1 α in tumor cells, and the effect of the use of the studied compound exceeded the effect of the referent. The suppression of Hif-1 α expression during ATACL administration to animals is probably associated with the effect of this substance, as a representative of a number of cinnamic acid derivatives, on the PI3K/Akt signaling pathway [24, 25]. The PI3K/Akt signaling pathway can regulate HIF-1 α degradation by the means of different mechanisms. One mechanism is mediated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), the second is associated with the activation of FOXO4 [26]. GSK-3 phosphorylates serine 551 (Ser551), threonine 555 (Thr555), and serine 589 (Ser589) Hif-1 α , after which it is ubiquitinated and destroyed [27]. FOXO4 can also induce ubiquitination and degradation of HIF-1 α [28]. Further changes in the intracellular metabolism of tumor cells, which were observed with the use of the test substance and the reference, are mediated by inhibition of Hif-1 α . Thus, against the background of ATACL and resveratrol administration to animals, an increase in mitochondrial biogenesis was noted, as evidenced by an increase of the activity of mitochondrial origin enzymes such as

біогенезу, про що свідчить підвищення активності ферментів мітохондріального походження – сукцинат-дегідрогенази та цитохром-с-оксидази. Підвищення пулу метаболічно активних мітохондрій призвело до зміцнення реакцій обміну на користь аеробного шляху та підвищення споживання кисню пухлинними клітинами. Зміни, що відбулися, певно, сприяли переключенню струму електронів основним мітохондріальним електронтранспортним ланцюгом, що призвело до випадання реакцій, опосередкованих НАДФ-оксидазою, та активацією апоптотичного каскаду [29, 30]. Внаслідок описаних метаболічних змін введення референту та сполуки ATACL сприяло зменшенню об'єму пухлини.

succinate dehydrogenase and cytochrome c oxidase. An increase in the number of metabolically active mitochondria led to a shift in metabolic reactions in favor of the aerobic pathway and an increase in oxygen consumption by tumor cells. The resulting changes, most likely, contributed to the switching of the electron current along the main mitochondrial electron transport chain, which led to the loss of reactions mediated by NADP oxidase and activation of the apoptotic cascade [29, 30]. As a result of the described metabolic changes, the administration of the referent and ATACL compound reduced the tumor volume.

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження показало, що застосування 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричної кислоти сприяло регресу пухлинного росту імплантованих у головний мозок клітин C6-BU-1 за рахунок пригнічення Hif-1 α -опосередкованих метаболічних реакцій. Так, з введенням 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричної кислоти відмічено зниження концентрації Hif-1 α в пухлинних клітинах на 27,4 % ($p < 0,05$), посилення мітохондріального біогенезу та зсув реакцій обміну на користь аеробного каскаду. Таким чином, 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил корична кислота за допомогою нівелювання парадоксу Варбурга може отримати протипухлинну активність.

CONCLUSIONS

The study showed that the use of 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid contributed to the regression of tumor growth of C6-BU-1 cells implanted into the brain by suppressing Hif-1 α -mediated metabolic reactions. Thus, with the 4-hydroxy-3,5-di-tret butyl cinnamic acid administration, a decrease in the concentration of Hif-1 α in tumor cells by 27.4 % ($p < 0.05$), an increase in mitochondrial biogenesis and a shift in metabolic reactions in favor of an aerobic cascade were noted. Thus, 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid, by leveling the Warburg paradox, may have antitumor activity.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Mattiuzzi C., Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*. 2019. Vol. 9, № 4. P. 217–222. DOI: <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
2. Kolpaktsidi I. P., Dmitrieva M. V., Yarosh I. V., Krasnyuk I. I. Antitumor drugs based on indolocarbazol derivatives. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021. Vol. 9, № 4. P. 252–265. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265>
3. Vaupel P., Schmidberger H., Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International journal of radiation biology*. 2019. Vol. 95, № 7. P. 912–919. DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019>
4. Vaupel P., Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Journal of physiology*. 2021. Vol. 599, № 6. P. 1745–1757. DOI: <https://doi.org/10.1113/JP278810>
5. Albadari N., Deng S., Li W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. Expert opinion on drug discovery. 2019. Vol. 14, № 7. P. 667–682. DOI: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1613370>
6. Datta K., Lauritzen M. H., Merchant M. et al. Reversed metabolic reprogramming as a measure of cancer treatment efficacy in rat C6 glioma model. *PLoS One*. 2019. Vol. 14, № 12. e0225313 p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225313>
7. Lu J., Tan M., Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer letters*. 2015. Vol. 356, № 2 Pt A. P. 156–164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.001>
8. Fallah J., Rini B. I. HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development. *Current oncology reports*. 2019. Vol. 21, № 1. 6 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0752-z>
9. Srivani G., Behera S. K., Dariya B., Aliya S., Alam A., Nagaraju G. P. Resveratrol binds and inhibits transcription factor HIF-1 α in pancreatic cancer. *Experimental cell research*. 2020. Vol. 394, № 1. 112126 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112126>
10. Pozdnyakov D. 4-Hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid restores the activity of the hippocampal mitochondria in rats under permanent focal cerebral ischemia. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021. Vol. 24, № 11. P. 1590–1601. DOI: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2021.58435.12979>
11. Paxinos G. The Rat Nervous System. Sydney, Australia: Academic Press; 1984.
12. Arteaga O., Revuelta M., Urigüen L., Álvarez A., Montalvo H., Hilario E. Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *PLoS One*. 2015. Vol. 10, № 11. e0142424 p. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142424>

REFERENCES

1. Mattiuzzi C., Lippi G. Current Cancer Epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*. 2019;9(4):217–22. (In English). DOI: <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
2. Kolpaktsidi IP, Dmitrieva MV, Yarosh IV, Krasnyuk II. Antitumor drugs based on indolocarbazol derivatives. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):252–65. (In English). DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265>
3. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. *International journal of radiation biology*. 2019;95(7):912–9. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/09553002.2019>
4. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Journal of physiology*. 2021;599(6):1745–57. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1113/JP278810>
5. Albadari N, Deng S, Li W. The transcriptional factors HIF-1 and HIF-2 and their novel inhibitors in cancer therapy. *Expert opinion on drug discovery*. 2019;14(7):667–82. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1613370>
6. Datta K, Lauritzen MH, Merchant M et al. Reversed metabolic reprogramming as a measure of cancer treatment efficacy in rat C6 glioma model. *PLoS One*. 2019;14(12):e0225313. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225313>
7. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer letters*. 2015;356(2 Pt A):156–64. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.001>
8. Fallah J, Rini BI. HIF Inhibitors: Status of Current Clinical Development. *Current oncology reports*. 2019;21(1):6. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0752-z>
9. Srivani G, Behera SK, Dariya B, Aliya S, Alam A, Nagaraju GP. Resveratrol binds and inhibits transcription factor HIF-1 α in pancreatic cancer. *Experimental cell research*. 2020;394(1):112126. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112126>
10. Pozdnyakov D. 4-Hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid restores the activity of the hippocampal mitochondria in rats under permanent focal cerebral ischemia. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2021;24(11):1590–601. (In English). DOI: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2021.58435.12979>
11. Paxinos G. The Rat Nervous System. Sydney, Australia: Academic Press; 1984. (In English).
12. Arteaga O, Revuelta M, Urigüen, Álvarez A, Montalvo H, Hilario E. Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142424. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142424>

13. Pozdnyakov D., Voronkov A. Correction of Mitochondrial Dysfunction by 4-Hydroxy-3,5-Ditertbutyl Cinnamic Acid in Experimental Alzheimer's Disease Induced by A β Injection in Rats. *Pharmaceutical Sciences*. 2021. Vol. 27, № 3. P. 313–325. DOI: <https://doi.org/10.34172/PS.2020.92>
14. Wang X., Leverin A. L., Han W. Isolation of brain mitochondria from neonatal mice. *Journal of neurochemistry*. 2011. Vol. 119, № 6. P. 1253–1261. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07525.x>
15. Pozdnyakov D. I., Voronkov A. V., Miroshnichenko K. A., Adzhiahmetova S. L., Chervonnaya N. M., Rukovitchina V. M. Pyrimidine-4H-10H derivatives restore mitochondrial function in experimental chronic traumatic encephalopathy. *Pharmacologyonline*. 2019. Vol. 3. P. 36–45.
16. Li Y., D'Aurelio M., Deng J. H. An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2007. Vol. 282, № 24. P. 17557–17562. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M701056200>
17. Wang H., Huwaimel B., Verma K. Synthesis and Antineoplastic Evaluation of Mitochondrial Complex II (Succinate Dehydrogenase) Inhibitors Derived from Atpenin A5. *ChemMedChem*. 2017. Vol. 12, № 13. P. 1033–1044. DOI: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700196>
18. Ryzhova O. A., Moroz T. L. Results of import substitution analysis of anti-cancer medications in the Russian Federation (2013–2018). *Pharmacy & Pharmacology*. 2019. Vol. 7, № 2. P. 105–111. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-2-105-111>
19. Hafeez U., Parakh S., Gan H. K., Scott A. M. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 20. 4764 p. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25204764>
20. Cai Z., Li C. F., Han F., Liu C., Zhang A., Hsu C. C. et al. Phosphorylation of PDHA by AMPK Drives TCA Cycle to Promote Cancer Metastasis. *Molecular cell*. 2020. Vol. 80, № 2. P. 263–278.e7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.018>
21. Zhang Y., Zhang R., Ni H. Eriodictyol exerts potent anticancer activity against A549 human lung cancer cell line by inducing mitochondrial-mediated apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *Archives of medical science : AMS*. 2019. Vol. 16, № 2. P. 446–452. DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.85152>
22. Vaupel P., Multhoff G. Fatal Alliance of Hypoxia/HIF-1 α -Driven Micro-environmental Traits Promoting Cancer Progression. *Advances in experimental medicine and biology*. 2020. Vol. 1232. P. 169–176. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-34461-0_21
23. Li R. L., He L. Y., Zhang Q., Liu J., Lu F. et al. HIF-1 α is a Potential Molecular Target for Herbal Medicine to Treat Diseases. *Drug design, development and therapy*. 2020. Vol. 14. P. 4915–4949. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S274980>
24. Zhu R., Liu H., Liu C., Wang L., Ma R., Chen B. et al. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacological research*. 2017. Vol. 122. P. 78–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.019>
25. Zhou Y., Fu X., Guan Y., Gong M., He K., Huang B. 1,3-Dicaffeoylquinic acid targeting 14-3-3 tau suppresses human breast cancer cell proliferation and metastasis through IL6/JAK2/PI3K pathway. *Biochemical pharmacology*. 2020. Vol. 172. 113752 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113752>
26. Hoxhaj G., Manning B. D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature reviews. Cancer*. 2020. Vol. 20, № 2. P. 74–88. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
27. Flügel D., Görlach A., Michiels C., Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and cellular biology*. 2007. Vol. 27, № 9. P. 3253–3265. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.00015-07>
28. Liu W., Li Y., Luo B. Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression. *Cellular and molecular life science*. 2020. Vol. 77, № 4. P. 651–663. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03297-w>
29. Moloney J. N., Cotter T. G. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*. 2018. Vol. 80. P. 50–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
30. Voronkov A. V., Pozdnyakov D. I., Nigaryan S. A., Khouri E. I., Miroshnichenko K. A., Sosnovskaya A. V., Olokhova E. A. Evaluation of the mitochondria respirometric function in the conditions of pathologies of various geneses. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019. Vol. 7, № 1. P. 20–31. DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31>
31. Pozdnyakov D., Voronkov A. Correction of Mitochondrial Dysfunction by 4-Hydroxy-3,5-Ditertbutyl Cinnamic Acid in Experimental Alzheimer's Disease Induced by A β Injection in Rats. *Pharmaceutical Sciences*. 2021;27(3):313–25. (In English). DOI: <https://doi.org/10.34172/PS.2020.92>
32. Wang X, Leverin A., Han W. Isolation of brain mitochondria from neonatal mice. *Journal of neurochemistry*. 2011;119(6):1253–61. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07525.x>
33. Pozdnyakov DI, Voronkov AV, Miroshnichenko KA, Adzhiahmetova SL, Chervonnaya NM, Rukovitchina VM. Pyrimidine-4H-10H derivatives restore mitochondrial function in experimental chronic traumatic encephalopathy. *Pharmacologyonline*. 2019;3:36–45. (In English).
34. Li Y, D'Aurelio M, Deng JH. An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(24):17557–62. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M701056200>
35. Wang H, Huwaimel B, Verma K. Synthesis and Antineoplastic Evaluation of Mitochondrial Complex II (Succinate Dehydrogenase) Inhibitors Derived from Atpenin A5. *ChemMedChem*. 2017;12(13):1033–44. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700196>
36. Ryzhova OA, Moroz TL. Results of import substitution analysis of anti-cancer medications in the Russian Federation (2013–2018). *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(2):105–11. (In English). DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-2-105-111>
37. Hafeez U, Parakh S, Gan HK, Scott AM. Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy. *Molecules*. 2020;25(20):4764. (In English). DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25204764>
38. Cai Z, Li CF, Han F, Liu C, Zhang A, Hsu CC et al. Phosphorylation of PDHA by AMPK Drives TCA Cycle to Promote Cancer Metastasis. *Molecular cell*. 2020;80(2):263–78.e7. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.09.018>
39. Zhang Y, Zhang R, Ni H. Eriodictyol exerts potent anticancer activity against A549 human lung cancer cell line by inducing mitochondrial-mediated apoptosis, G2/M cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway. *Archives of medical science : AMS*. 2019;16(2):446–52. (In English). DOI: <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.85152>
40. Vaupel P, Multhoff G. Fatal Alliance of Hypoxia/HIF-1 α -Driven Microenvironmental Traits Promoting Cancer Progression. *Advances in experimental medicine and biology*. 2020;1232:169–76. (In English). DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-34461-0_21
41. Li RL, He LY, Zhang Q, Liu J, Lu F et al. HIF-1 α is a Potential Molecular Target for Herbal Medicine to Treat Diseases. *Drug design, development and therapy*. 2020;14:4915–49. (In English). DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S274980>
42. Zhu R, Liu H, Liu C, Wang L, Ma R, Chen B. et al. Cinnamaldehyde in diabetes: A review of pharmacology, pharmacokinetics and safety. *Pharmacological research*. 2017;122:78–89. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.019>
43. Zhou Y, Fu X, Guan Y, Gong M, He K, Huang B. 1,3-Dicaffeoylquinic acid targeting 14-3-3 tau suppresses human breast cancer cell proliferation and metastasis through IL6/JAK2/PI3K pathway. *Biochemical pharmacology*. 2020;172:113752. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113752>
44. Hoxhaj G, Manning BD. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature reviews. Cancer*. 2020;20(2):74–88. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>
45. Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates hypoxia-inducible factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(9):3253–65. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.00015-07>
46. Liu W, Li Y, Luo B. Current perspective on the regulation of FOXO4 and its role in disease progression. *Cellular and molecular life science*. 2020;77(4):651–63. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03297-w>
47. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in cell & developmental biology*. 2018;80:50–64. (In English). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
48. Voronkov AV, Pozdnyakov DI, Nigaryan SA, Khouri EI, Miroshnichenko KA, Sosnovskaya AV, Olokhova EA. Evaluation of the mitochondria respirometric function in the conditions of pathologies of various geneses. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(1):20–31. (In English). DOI: <https://doi.org/10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31>

Перспективи подальших досліджень

Prospects for further research

Доцільно продовжувати поглиблене вивчення протипухлинних ефектів 4-гідрокси-3,5-ди-трет-бутил коричної кислоти на різних моделях пухлинного росту, як *in vivo*, так і у клітинних культурах.

It is advisable to continue the in-depth study of the antitumor effects of 4-hydroxy-3,5-di-tret-butyl cinnamic acid in various models of tumor growth, both *in vivo* and in cell cultures.

Конфлікт інтересів

Conflict of interest

Автори рукопису свідомо засвідчують відсутність фактичного або потенційного конфлікту інтересів щодо результатів цієї роботи з фармацевтичними компаніями, виробниками біомедичних пристроїв, іншими організаціями, чиї продукти, послуги, фінансова підтримка можуть бути пов'язані з предметом наданих матеріалів або які спонсорували проведення дослідження.

The authors of the manuscript knowingly acknowledge the absence of actual or potential conflict of interest regarding the results of this work with pharmaceutical companies, manufacturers of biomedical devices, other organizations whose products, services, financial support may be related to the subject of materials or who sponsored research.

Інформація про фінансування

Funding information

Дослідження виконано на кошти авторів.

The study was performed at the expense of the authors.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Поздняков Дмитро Ігорович – кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри фармакології з курсом клінічної фармакології П'ятигорського медико-фармацевтичного інституту – філії Федерального державного бюджетного освітнього закладу вищої освіти «Волгоградський державний медичний університет» Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації; пр. Калініна, буд. 11, м. П'ятигорськ, Росія, 357532; e-mail: fharmklinika_2020@gmail.com
mob.: +78 (793) 32-44-74

Внесок автора: концепція та дизайн дослідження, виконання дослідження, аналіз результатів, статистична обробка результатів, написання тексту статті.

Корянова Ксенія Миколаївна – кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри фармакології з курсом клінічної фармакології П'ятигорського медико-фармацевтичного інституту – філії Федерального державного бюджетного освітнього закладу вищої освіти «Волгоградський державний медичний університет» Міністерства охорони здоров'я Російської Федерації; пр. Калініна, буд. 11, м. П'ятигорськ, Росія, 357532; e-mail: ksjukor@gmail.com
mob.: +78 (793) 32-44-74

Внесок автора: виконання дослідження, аналіз результатів, написання тексту статті.

Pozdnyakov Dmitry Igorevich – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology with a course in Clinical Pharmacology of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation; 11, Kalinina Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532; e-mail: fharmklinika_2020@gmail.com
tel.: +78 (793) 32-44-74

Author's contribution: the concept and design of the study, the execution of the study, the analysis of the results, the statistical processing of the results, the writing of the text of the article.

Koryanova Ksenia Nikolaevna – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmacology with a course of Clinical Pharmacology of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University of the Ministry of Health of Russian Federation; 11, Kalinina Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532; e-mail: ksjukor@gmail.com
mob.: +78 (793) 32-44-74

Author's contribution: doing the research, analyzing the results, writing the text of the article.

Рукопис надійшов
Manuscript was received
22.11.2021

Отримано після рецензування
Received after review
01.12.2021

Прийнято до друку
Accepted for printing
23.12.2021

Опубліковано
Published
29.12.2021