

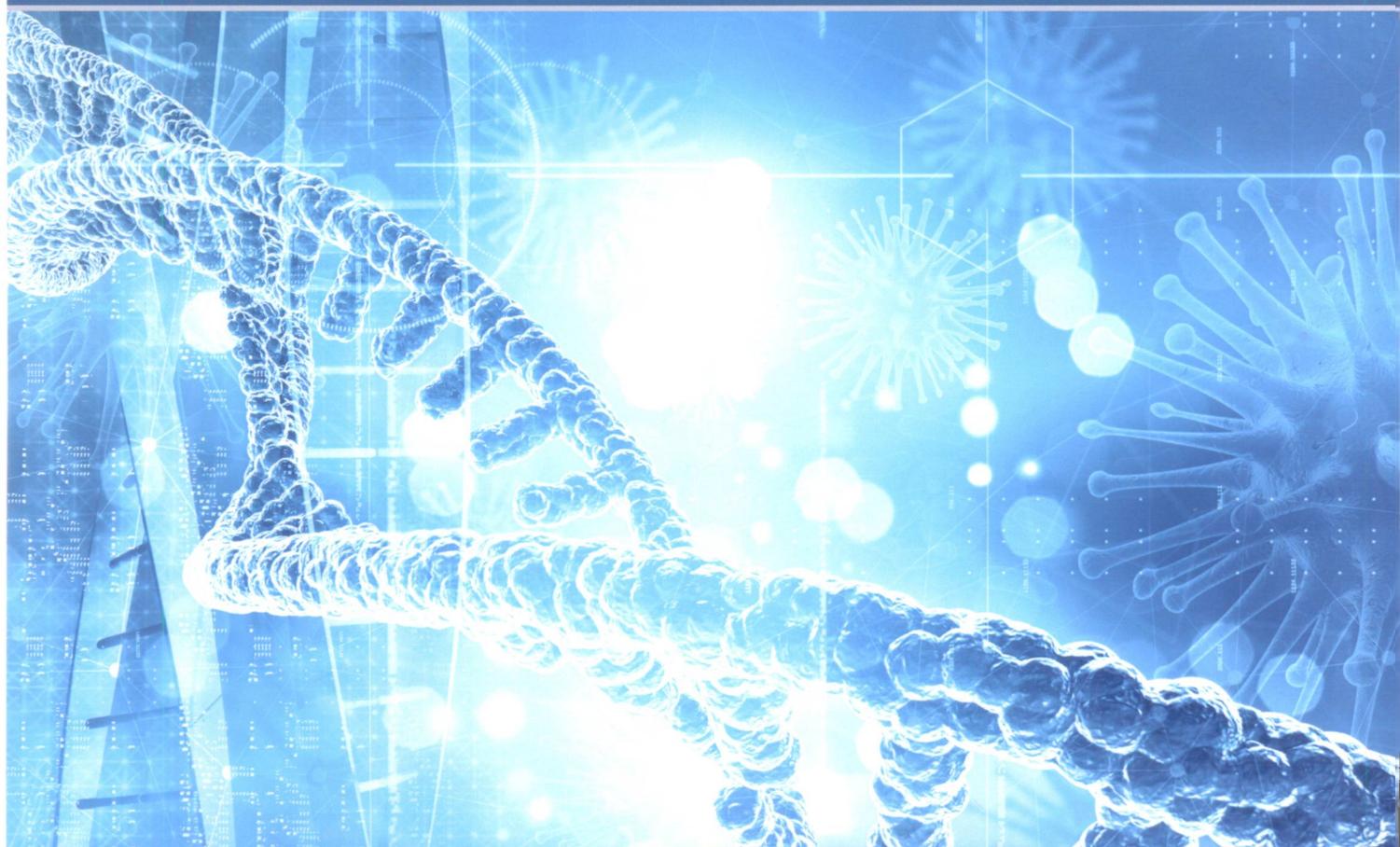


Республиканское научно-исследовательское
унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически
активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»

ISSN 2957-7349

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY



TOM / VOL. 1

1(1)2022

БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

БІЯХІМІЯ І МАЛЕКУЛЯРНАЯ БІЯЛОГІЯ

ISSN 2957-7349



РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ

Основан
в 2022 году

Учредитель

Республиканское научно-исследовательское
унитарное предприятие
«Институт биохимии биологически
активных соединений
Национальной академии наук Беларуси»

*Издано при финансовой поддержке
Белорусского республиканского фонда
фундаментальных исследований*

Адрес редакции:

пл. Антония Тызенгауза, 7,
230023, г. Гродно, Республика Беларусь,
Институт биохимии биологически
активных соединений НАН Беларуси,
тел.: +375 152 55-87-78,
e-mail: journal@ibiochemistry.by

Официальный сайт журнала
<https://ibiochemistry.by>

Подписные индексы:

для индивидуальных подписчиков **00990**
для ведомственных подписчиков **009902**

Отпечатано в типографии
УП «ИВЦ Минфина»
Подписано в печать 29.09.2022.
Формат 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура TimesNewRoman. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 16,04. Уч.-изд. л. 13,80.
Тираж 100 экз. Заказ 324.
ЛП № 02330/89 от 3 марта 2014 г.
Ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.

В номере:

**Экспериментальные
и клинические исследования**

Обзоры

Ученые Беларуси

Том 1

1 (1)/2022

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
EXPERIMENTAL AND CLINICAL RESEARCH

В.В. Хрусталёв, Т.Е. Касько, В.В. Побойнев, Т.А. Хрусталёва USSA – МЕТОД ОПИСАНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ	8	V.V. Khrustalev, T.E. Kasko, V.V. Poboinev, T.A. Khrustaleva USSA – SECONDARY STRUCTURE ASSIGNMENT METHOD FOR PROTEINS
Л.И. Надольник, В.Ч. Полубок, С.В. Лупачик, В.В. Виноградов НАРУШЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ НЕЙРОГОРМОНАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ НА ФОНЕ ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ И ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА У САМЦОВ И САМОК КРЫС	16	L.I. Nadolnik, V.Ch. Polubok, S.V. Lupachik, V.V. Vinogradov IMPAIRMENTS IN MECHANISMS OF NEUROHORMONAL REGULATION PROVOKED BY HIGH-FAT DIET AND TYPE 2 DIABETES IN MALE AND FEMALE RATS
Т.А. Коваленя, Е.Б. Белоновская, И.А. Кузьмицкая, С.Н. Кирко, Е.А. Лапшина, Ю.В. Ерошенко, И.Б. Заводник, Т.В. Ильич, В.У. Буко ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ АНТОЦИАНОВ КРАСНОКОЧАННОЙ КАПУСТЫ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У КРЫС: РЕГУЛЯЦИЯ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ	24	T.A. Kavalenia, E.A. Lapshina, I.B. Zavodnik, T.V. Ilyich, V.Y. Buko, E.B. Belonovskaya, S.N. Kirko, I.A. Kuzmitskaya, Yu.V. Eroshenko HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF RED CABBAGE ANTHOCYANINS DURING ALCOHOLIC INTOXICATION IN RATS: REGULATION OF MITOCHONDRIAL ACTIVITY
А.Д. Таганович, Н.Н. Ковганко, В.И. Прохорова, Л. А. Державец, А.В. Колб, Д.И. Мурашко МОДЕЛЬ ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО НА ОСНОВЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ КРОВИ	32	A.D. Tahanovich, N.N. Kauhanka, V.I. Prokhorova, L.A. Derzhavets, A.V. Kolb, D.I. Murashko THE MODEL OF EARLY DETECTION OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER BASED ON THE DETERMINATION OF BLOOD PROTEINS
В.Н. Никандров, И.А. Ильючик, В.Н. Коваленко, В.А. Яцушкевич ВЛИЯНИЕ КЕТОНОВ ФЕНИЛПРОПАНОвого РЯДА НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗ	40	V.N. Nikandrov, I.A. Ilyuchyk, V.N. Kovalenko, V.A. Yatsushkevich EFFECT OF PHENYLPROPANOID KETONES ON ACTIVITY OF THE PROTEINASES
М.А. Шарангович, А.Л. Лагоненко, Е.А. Николайчик ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ РЕГУЛЯТОР <i>SlyA</i> ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ КАК СЕНСОР РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	47	M.A. Sharanhovich, A.L. Lagonenko, Y.A. Nikolaichik TRANSCRIPTIONAL REGULATOR <i>SlyA</i> OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AS A SENSOR OF PLANT PHENOLIC COMPOUNDS

Д.С. Семенович, Н.П. Канунникова,
Е.П. Лукиенко, П.А. Савко, А.Г. Мойсеев
ИЗМЕНЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА
В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ
БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА И ДЕЙСТВИИ
ПРОИЗВОДНЫХ ПАНТОТЕНОВОЙ
КИСЛОТЫ

53

D.S. Semenovich, N.P. Kanunnikova,
E.P. Lukiyenko, P.A. Savko, A.G. Moiseenok
CHANGES IN OXIDATIVE STRESS
IN RAT BRAIN STRUCTURES
IN THE EXPERIMENTAL MODEL
OF ALZHEIMER'S DISEASE AND THE
ACTION OF PANTOTHENIC ACID
DERIVATIVES

Ю.И. Ярец
ХАРАКТЕРИСТИКА БИОХИМИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ
ПЕРСИСТЕНТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
РАНЕВОГО ОТДЕЛЯЕМОГО ПАЦИЕНТОВ

60

Yu.I. Yarets
CHARACTERIZATION OF BIOCHEMICAL
MARKERS THAT DETERMINE THE
PERSISTENT POTENTIAL OF BACTERIA
ISOLATED FROM THE WOUND
DISCHARGE OF PATIENTS

В.В. Побойнев, В.В. Хрусталёв,
Т.А. Хрусталёва
МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ДОМЕНА
ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСА ГРИППА
A/H1N1 С МАТРИКСНЫМ БЕЛКОМ М1

67

V.V. Poboinev, V.V. Khrustalev,
T.A. Khrustaleva
MODELING OF INTERACTION BETWEEN
CYTOPLASMIC DOMAIN OF INFLUENZA
A/H1N1 VIRUS HEMAGGLUTININ
AND THE MATRIX PROTEIN M1

Д.И. Мурашко, А.Д. Таганович, Н.Н. Ковганко,
В.И. Прохорова, О.В. Готько
ОЦЕНКА ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
В КАЧЕСТВЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТОВ УРОВНЯ
CD44V6, HIF-1A И ГИАЛУРОНОВОЙ
КИСЛОТЫ В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ
С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ
ЛЕГКОГО ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ
РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ОПУХОЛИ

74

D.I. Murashka, A.D. Tahanovich, M.M. Kauhanka,
V.I. Prokhorova, O.V. Gotko
EVALUATION OF THE FEASIBILITY
OF USING THE LEVEL OF CD44V6,
HIF-1A AND HYALURONIC ACID
IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH
NON-SMALL CELL LUNG CANCER
IN DETERMINING TUMOR
EXPANSION

М.А. Мурина, П.А. Овчинников,
Д.И. Рощупкин
ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ХЛОРАМИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
АНАЛОГОВ АДЕНОЗИНА В СУСПЕНЗИИ
ЭРИТРОЦИТОВ

80

M.A. Murina, P.A. Ovchinnikov,
D.I. Roshchupkin
HEMOLYTIC ACTIVITY
OF CHLORAMINE DERIVATIVE
OF ADENOSINE ANALOGS IN
A SUSPENSION OF ERYTHROCYTES

В.М. Коденцова, О.А. Вржесинская,
О.В. Кошелева, Н.А. Бекетова, А.А. Сокольников,
Г.В. Гусева, С.Н. Леоненко, Н.В. Жилинская
БИОХИМИЧЕСКИЕ
ПОКАЗАТЕЛИ ПЛАЗМЫ КРОВИ
ПРИ МНОЖЕСТВЕННОЙ
МИКРОНУТРИЕНТНОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ И ЕЕ КОРРЕКЦИИ
У КРЫС

86

V.M. Kodentsova, O.A. Vrzhesinskaya,
O.V. Kosheleva, N.A. Beketova,
A.A. Sokolnikov, G.V. Guseva,
S.N. Leonenko, N.V. Zhilinskaya
BLOOD PLASMA BIOCHEMICAL
PARAMETERS IN RATS UNDER MULTIPLE
MICRONUTRIENT DEFICIENCY AND
ITS CORRECTION

В.Э. Сяхович, Е.Я. Рута-Жуковская,
К.А. Лобода, Д.В. Бабарико,
Ю.С. Бакакина, Ю.Г. Походня
ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИЗОФОРМ ГОРМОНА
РОСТА ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
МЕТОДА ПРОТЕОМИКИ «БОТТОМ-UP»

90

V.E. Syakhovich, E.Ya. Ruta-Zhukouskaia,
K.A. Loboda, D.V. Babaryko,
Yu.S. Bakakina, Yu.G. Pakhadnia
IDENTIFICATION OF HUMAN GROWTH
HORMONE ISOFORMS USING «BOTTOM-
UP» PROTEOMICS

ОБЗОРЫ / REVIEWS

С.М. Зиматкин МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ОЦЕНКЕ СОСТОЯНИЯ НЕЙРОНОВ МОЗГА	97	S.M. Zimatkin MOLECULAR MARKERS IN THE ASSESSMENT OF THE STATE OF BRAIN NEURONS
П.А. Каравай, Л.И. Нефёдов СВОБОДНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ В КАЧЕСТВЕ РЕГУЛЯТОРОВ МЕТАБОЛИЗМА ПРИ СЕДЕЧНО- СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ (ОБЗОР)	104	P.A. Karavay, L.I. Nefyodov FREE AMINO ACIDS AS METABOLISM REGULATORS IN CARDIOVASCULAR PATHOLOGY (REVIEW)
В.В. Лелевич МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИЗУЧЕНИЯ АЛКОГОЛИЗМА	110	V.V. Lelevich METHOLOGICAL ASPECTS OF EXPERIMENTAL STUDIES IN ALCOHOLISM
А.А. Чиркин, П.Ю. Пинчук МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОТБОРА МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ	114	A.A. Chirkin, P.Yu. Pinchuk MOLECULAR BIOLOGICAL CRITERIA FOR SELECTION OF MODEL ORGANISMS FOR BIOMEDICAL STUDIES
Ю.Х. Мараховский, О.М. Жарская СОПОСТАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ВОЗРАСТА И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ГИБКОСТИ ПОЗВОЛЯЮТ УТОЧНИТЬ ВАРИАНТНОСТЬ ДИСМЕТАБОЛИЗМА: МИНИ-ОБЗОР И СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ	119	Yu.K. Marakhouski, O.M. Zharskaya COMPARISON OF BIOLOGICAL AGE AND METABOLIC FLEXIBILITY ALLOWS US TO CLARIFY THE VARIANCE OF DYSMETABOLISM: MINI-REVIEW AND OWN RESULTS

УЧЕННЫЕ БЕЛАРУСИ / SCIENTISTS OF BELARUS

К 80-летию со дня рождения профессора Вячеслава Ульяновича Буко	126	On the occasion of the 80-th birthday of Professor Vyacheslav Buko
Правила для авторов журнала «Биохимия и молекулярная биология»	135	Information for authors of the «Biochemistry and Molecular Biology» journal

ВЛИЯНИЕ КЕТОНОВ ФЕНИЛПРОПАНОВОГО РЯДА НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗ

В.Н. Никандров¹, И.А. Ильючик¹, В.Н. Коваленко², В.А. Яцушкевич¹

¹Учреждение образования «Полесский государственный университет»,
г. Пинск, Республика Беларусь;

²Учреждение образования «Белорусский государственный педагогический университет
имени Максима Танка», г. Минск, Республика Беларусь

Введение. Для эффективной репродукции ряда вирусов, включая вирус иммунодефицита человека и коронавируса, важна функция присущих им протеиназ, в частности близкой пепсину, α -химотрипсин-подобной и папаин-подобной, что обуславливает необходимость изыскания эффективных ингибиторов этих энзимов.

Цель исследования – раскрыть особенности действия ряда соединений кетонов фенилпропанового ряда на активность пепсина, α -химотрипсина и папаина.

Материалы и методы. Методом лизиса желатина в тонком слое геля агары определена активность очищенных образцов протеиназ при добавлении синтезированных кетонов фенилпропанового ряда.

Результаты. Добавление к пепсину зингерона (10^{-3} – 10^{-5} М), гесперидина и пара-гидроксibenзила камфоры (10^{-2} – 10^{-8} М), камфоры (10^{-3} М) усилило расщепление желатина на 27–35, 22–48 и 25% соответственно. Действие кетона малины (10^{-3} – 10^{-8} М) не превышало 17%. Слабый ингибиторный эффект (13–25%) вызвало добавление к энзиму пара-гидроксibenзил пинаколина и ванилиден вербенона (10^{-2} – 10^{-7} М).

Желатинолитическая активность α -химотрипсина при добавлении гесперетина (10^{-3} – 10^{-7} М) возрас-тала на 11–23%; в присутствии пара-гидроксibenзилиден пинаколина (10^{-3} – 10^{-8} М) отмечены колебания – рост активности протеиназы на 20–25% и ее снижение на 20–26%.

Добавление к папаину пара-гидроксibenзилидена пинаколина, ванилиден камфоры (10^{-3} – 10^{-8} М) и гесперидина (10^{-4} – 10^{-8} М) вело к росту расщепления желатина на 18–40 и 16–24% соответственно. Угнетение активности этой протеиназы на 19–20% вызвал зингерон в минимальных концентрациях.

Заключение. Сопоставляя полученные результаты с данными литературы представляется целесообразным вести дальнейшие изыскания ингибиторов пепсина, папаина и α -химотрипсина, учитывая O_2^- -зависимый характер их действия, в направлении создания водорастворимых полифенольных соединений.

Ключевые слова: пепсин, α -химотрипсин, папаин, протеолитическая активность, кетоны фенилпропанового ряда.

Введение

Появление новых возбудителей заболеваний вирусной этиологии настоятельно требует изыскания эффективных средств подавления их репродукции в организме, тем более, что вследствие изменчивости вирусов уже применяемые препараты оказываются недостаточно эффективными.

В структурно-функциональной специфике ряда вирусов заметную роль играют протеиназы. Протеолиз вообще является одним из генеральных механизмов биохимической регуляции метаболизма и жизнедеятельности клеток, тканей и органов организма, а в отношении вирусов – ретровирусов (в частности, вируса иммунодефицита), флавивирусов, вирусов герпеса, гепатита С, энтеровирусов, риновирусов, пикорнавируса 3С – реализации их репродукции [1, 2].

Так, аспартильная структурно близкая пепсину протеиназа вируса иммунодефицита человека *HIV-1 PR* (EC 3.4.23.16) ответственна за созрева-

ние предшественников полипротеинов *Gag* и *Pol* в зрелые вирусные энзимы и структурные белки ретровирусов [3, 4].

У вызвавшего пандемию коронавируса обнаружены папаин-подобная протеиназа (*PLP*), отрицательно регулирующая врожденный иммунный ответ путем нарушения *STING*(стимуляторов генов интерферона)-опосредованного сигналинга и 3-химотрипсин-подобная основная протеиназа (*3Clpro/Mpro*), составляющая наряду с папаин-подобными протеиназами основной протеиназный аппарат бета-коронавирусов, необходимый для процессинга полипротеинов, транслируемых из вирусных РНК [5–7].

Использование для лечения ВИЧ(вирус иммунодефицита человека)-инфицированных пациентов ингибиторов протеиназы первого поколения (индинавир, ритонавир, саквинавир и др.) показало, что у вирусов довольно быстро развивается резистентность к препаратам. Это обу-

словлено мутациями в гене, кодирующем протеиназу. Такое явление вполне реально и для других вирусов.

В настоящее время в качестве ингибиторов вирусных протеиназ используют пептидомиметики, соединения с циклическим карбамидом, 4-гидроксикумарином, маннурановой кислотой или 4-гидрокси-5,6-дигидро-2-пирролом вместо гидроксипропилового ядра, а также нафтохиноны и другие вещества [2].

Вследствие возможных мутаций указанного характера и развития резистентности из-за аминокислотных замен в молекулах соответствующих протеиназ вирусов целесообразно расширение арсенала соединений, ингибирующих их протеолитические свойства.

Ранее было высказано соображение, что для первичного отбора ингибиторов протеиназы ВИЧ возможно использование пепсина как аналога этой протеиназы [8]. В силу этого логично полагать, что аналогами протеиназ коронавируса будут α -химотрипсин и папаин, которые можно использовать для первичного отбора ингибиторов.

Целью настоящей работы явилось исследование действия ряда фенолпропаноидов, в частности кетонов фенолпропанового ряда зингерона, кетона малины и их структурных аналогов на активность пепсина, α -химотрипсина и папаина.

Материалы и методы

В работе использованы образцы α -химотрипсина (ЕС 3.4.21.1) быка, пепсина (ЕС 3.4.23.1) свиньи (Sigma, США), папаина (ЕС 3.4.22.2, AppliChem, Германия), желатина свиньи (Fluka, Швейцария), агара (Melford, США).

Другие реактивы квалификации «хч» или «чда» были производства стран СНГ, их использовали после соответствующей дополнительной очистки.

Ниже приведенные соединения 2, 3, 5, 10, 11 получены конденсацией ароматических альдегидов (ванилина либо *пара*-гидроксибензальдегида) с соответствующими кетонами [9]. Соединения 1, 4, 9 получены соответственно из 2, 3, 11 гидрированием двойной связи, кетон малины 8 – гидрированием *пара*-гидроксибензальацетона [9]. Гесперидин 7 выделен из кожуры апельсина и очищен согласно методу [10], гесперетин 6 получен отщеплением гликозидной части гесперицина 7 в кислой среде [10].

Протеолитическую активность определяли по лизису желатина в тонком слое агар-агара как подробно описано ранее [11]. Концентрация желатина составляла 10 г/л, агар-агара – 10 г/л. В качестве растворителя для приготовления протеин-ага-

ровых пластин использовали 0,15 М раствор NaCl, растворы энзимов готовили на 0,05 М трис-HCl буфере pH 7,4, а при работе с пепсином использовали 0,2 М ацетатный буфер pH 1,47. Пластинки с нанесенными пробами (10 мкл) инкубировали при +37 °С в течение 20 часов. Зоны лизиса визуализировали обработкой протеин-агаровых пластин 1 М трихлоруксусной кислотой.

Исследуемые соединения растворяли в этаноле или диметилсульфоксиде и добавляли к растворам протеиназ до конечной концентрации 10^{-2} – 10^{-8} М. В контрольные образцы вносили аликвоты соответствующих растворителей.

Содержание протеинов в растворах оценивали по величине абсорбции при 280 нм, используя соответствующие значения $A_{\text{см}}^{\%}$, приведенные в предыдущей статье [12].

Все исследования выполнены восьмикратно, результаты обработаны статистически с вычислением *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждения

Добавление к пепсину зингерона в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-5} М, а также гесперицина и *пара*-гидроксибензила камфоры в концентрации 10^{-2} – 10^{-8} М сопровождалось стимулирующей расщепления желатина на 27–35 и 22–48% соответственно (таблица). Действие кетона малины в концентрации 10^{-3} – 10^{-8} М было сходного характера, однако эффект не превышал 17%. Внесение к образцу пепсина камфоры также вело к увеличению интенсивности расщепления желатина на 25%, но лишь при концентрации 10^{-3} М. Дегидрозингерон, *пара*-гидроксибензилиден пинаколин и ванилиден камфора на активность этой протеиназы существенно не влияли. Слабый ингибиторный эффект (13–25%) вызвало добавление к энзиму *пара*-гидроксибензил пинаколина и ванилиден вербенона в концентрационном диапазоне 10^{-2} – 10^{-7} М.

На активность α -химотрипсина изучаемые соединения оказали несколько иное действие. В целом, оно было более слабым, а зингерон, гесперидин, *пара*-гидроксибензилиден камфора и камфора вообще влияния не оказали (таблица). Добавление гесперетина в концентрации 10^{-3} – 10^{-7} М вызвало увеличение желатинолитической активности химотрипсина на 11–23%.

Сложным оказался характер эффекта *пара*-гидроксибензилиден пинаколина: в диапазоне концентраций 10^{-3} – 10^{-8} М отмечены колебания – рост активности протеиназы на 20–25% и ее снижение на 20–26%. Для выяснения такой особенности необходимы дальнейшие исследования этого соединения более углубленного плана.

Таблица – Изменения расщепления желатина протеиназами при добавлении кетонов фенолпропанового ряда ($n = 8$)

Table – Changes of the gelatin cleavage by proteinases upon addition of phenylpropanoid ketones ($n = 8$)

Концентрация, М	Площадь расщепления желатина, мм ²		
	пепсином	α -химотрипсином	папаином
№ 1, зингерон, мол. масса 194,23			
Контроль	126,29±8,50	360,14±9,88	206,89±10,02
10 ⁻²	107,00±6,67	344,00±8,77	205,00±6,05
10 ⁻³	160,75±7,96*	361,63±10,95	195,31±5,55
10 ⁻⁴	168,13±3,74*	364,75±12,31	200,15±4,35
10 ⁻⁵	170,40±6,80*	368,17±13,22	211,13±3,77
10 ⁻⁶	123,71±8,21	371,83±14,65	188,53±6,40
10 ⁻⁷	127,33±6,55	388,14±10,26	165,30±6,76*
10 ⁻⁸	134,92±7,02	378,86±11,04	168,60±4,16*
№ 2, дегидрозингерон, мол. масса 192,21			
Контроль	112,34±4,21	305,38±11,50	186,00±6,75
10 ⁻²	106,50±3,61	298,10±7,43	185,89±6,34
10 ⁻³	113,83±4,26	266,00±6,92*	183,56±6,50
10 ⁻⁴	115,13±1,42	280,25±7,64	175,43±5,70
10 ⁻⁵	112,71±4,31	294,25±9,62	186,67±4,34
10 ⁻⁶	113,63±3,49	317,63±10,06	198,67±7,51
10 ⁻⁷	114,67±4,39	262,00±7,24*	193,78±7,50
10 ⁻⁸	112,29±3,74	329,81±13,71	208,90±6,19*
№ 3, пара-гидроксибензилиден пинаколин, мол. масса 204,26			
Контроль	194,11±5,68	307,88±15,68	146,14±7,16
10 ⁻²	201,63±6,81	346,84±15,69	184,33±4,81*
10 ⁻³	197,75±3,38	368,50±10,23*	180,00±6,80*
10 ⁻⁴	195,29±8,88	298,4±13,23	166,44±5,06*
10 ⁻⁵	195,80±4,73	246,75±5,48*	201,89±6,54*
10 ⁻⁶	187,50±7,18	384,00±11,91*	205,25±7,63*
10 ⁻⁷	200,61±6,62	227,80±5,24*	158,33±3,66
10 ⁻⁸	206,80±6,02	241,60±3,17*	172,03±4,72*
№ 4, пара-гидроксибензил пинаколин, мол. масса 284,35			
Контроль	141,50±4,58	343,71±14,93	195,33±5,89
10 ⁻²	106,65±2,89*	390,29±16,85	183,10±6,74
10 ⁻³	130,95±4,71	303,43±11,12	189,00±7,03
10 ⁻⁴	122,40±2,88*	310,50±9,31	192,89±6,28
10 ⁻⁵	122,55±3,29*	321,49±12,56	195,80±7,40
10 ⁻⁶	123,90±2,04*	300,70±8,46*	189,40±4,21
10 ⁻⁷	139,83±5,33	298,25±15,61	189,71±5,45
10 ⁻⁸	132,91±5,90	306,10±10,99	201,67±5,95
№ 5, ванилиден вербенон, мол. масса 284,35			
Контроль	202,11±5,91	373,30±10,08	171,60±5,39
10 ⁻²	165,64±6,36*	393,25±10,11	165,00±5,28
10 ⁻³	174,02±4,63*	397,88±14,16	176,78±3,58
10 ⁻⁴	173,33±8,10*	394,11±11,29	157,33±5,83
10 ⁻⁵	199,00±5,77	417,03±11,86	164,13±5,24
10 ⁻⁶	152,31±9,90*	425,00±13,46*	161,67±4,01
10 ⁻⁷	171,47±7,91*	400,00±11,56	172,22±6,14
10 ⁻⁸	232,05±7,92*	402,11±9,66	177,25±8,58
№ 6, гесперетин, мол. масса 302,28			
Контроль	151,11±5,22	371,71±8,44	129,86±4,86
10 ⁻²	155,60±6,40	379,14±9,52	110,71±2,78*
10 ⁻³	174,33±4,64*	432,71±5,84*	131,11±2,54
10 ⁻⁴	157,83±5,18	437,67±9,21*	129,56±2,28
10 ⁻⁵	154,75±5,31	439,47±10,53*	142,75±6,19
10 ⁻⁶	159,33±2,82	455,57±8,77*	136,44±3,46
10 ⁻⁷	154,57±3,19	411,30±7,17*	132,56±5,02
10 ⁻⁸	154,67±5,30	399,25±14,66	140,56±6,48

Концентрация, М	Площадь расщепления желатина, мм ²		
	пепсином	α -химотрипсином	папаином
№ 7, гесперидин, мол. масса 610,56			
Контроль	161,14±9,05	429,30±7,12	112,78±2,28
10 ⁻²	174,88±7,94	450,90±5,85*	127,22±2,09*
10 ⁻³	226,41±9,55*	450,00±14,17	125,13±4,40*
10 ⁻⁴	195,81±9,02*	416,06±8,57	130,67±5,31*
10 ⁻⁵	234,77±7,57*	406,03±12,39	135,78±4,18*
10 ⁻⁶	238,73±6,86*	424,27±13,31	140,25±2,99*
10 ⁻⁷	214,00±4,91*	425,38±7,69	135,33±3,75*
10 ⁻⁸	219,89±8,97*	451,02±12,24	134,43±4,23*
№ 8, кетон малины, мол. масса 164,20			
Контроль	186,29±3,51	365,43±6,05	173,37±6,49
10 ⁻²	188,89±4,77	359,57±10,17	172,89±5,63
10 ⁻³	207,13±6,24*	344,78±8,86	173,25±4,34
10 ⁻⁴	216,38±2,49*	364,75±9,42	188,11±4,57
10 ⁻⁵	197,83±1,84	338,89±13,34	194,57±8,37
10 ⁻⁶	210,14±3,59*	355,67±3,62	179,44±6,78
10 ⁻⁷	211,23±2,95*	329,25±8,71*	172,22±8,29
10 ⁻⁸	217,41±2,78*	305,25±9,62*	180,30±5,20
№ 9, пара-гидроксibenзил камфора, мол. масса 258,36			
Контроль	158,88±3,81	358,60±13,36	145,29±3,77
10 ⁻²	174,21±5,23	379,23±14,74	159,67±2,92*
10 ⁻³	209,17±3,88*	329,33±6,43	142,88±5,44
10 ⁻⁴	204,13±2,31*	349,75±7,35	157,57±6,60
10 ⁻⁵	194,29±3,06*	339,22±5,25	145,75±3,97
10 ⁻⁶	194,14±7,23*	310,67±11,68*	150,71±7,02
10 ⁻⁷	193,28±4,80*	356,33±18,49	147,50±5,45
10 ⁻⁸	192,00±3,14*	366,75±8,80	136,25±2,79
№ 10, ванилиден камфора, мол. масса 286,37			
Контроль	198,50±7,70	359,63±8,64	125,69±3,81
10 ⁻²	172,89±8,28	362,30±11,09	143,22±4,27*
10 ⁻³	183,22±6,26	365,25±10,83	148,67±3,96*
10 ⁻⁴	191,00±3,82	346,63±6,43	157,27±1,58*
10 ⁻⁵	211,13±4,97	347,25±12,56	130,68±1,98
10 ⁻⁶	188,80±7,57	328,20±5,21*	136,13±2,47
10 ⁻⁷	171,71±7,66	400,71±14,20*	168,58±2,22*
10 ⁻⁸	178,43±6,62	368,1±9,95	124,52±2,11
№ 11, пара-гидроксibenзилиден камфора, мол. масса 256,34			
Контроль	171,67±3,22	362,38±7,44	128,96±2,05
10 ⁻²	169,73±5,36	358,63±9,63	149,31±2,96*
10 ⁻³	167,33±7,84	363,50±5,09	140,09±4,35
10 ⁻⁴	168,57±3,72	353,80±12,27	127,38±2,04
10 ⁻⁵	155,83±3,14	369,57±7,71	130,19±3,77
10 ⁻⁶	167,52±4,99	382,83±10,05	119,53±3,21
10 ⁻⁷	166,56±5,71	352,25±9,18	123,93±2,19
10 ⁻⁸	134,67±2,33*	352,57±9,79	120,41±3,14
№ 12, камфора, мол. масса 152, 23			
Контроль	204,63±6,33	377,57±5,12	149,89±5,47
10 ⁻²	216,33±9,28	402,89±3,74	143,56±5,61
10 ⁻³	255,83±10,14*	347,55±3,38	149,38±5,56
10 ⁻⁴	215,29±15,69	385,73±4,95	138,60±5,92
10 ⁻⁵	204,31±6,12	367,00±3,65	138,67±5,43
10 ⁻⁶	190,13±10,52	395,35±4,95	152,56±7,50
10 ⁻⁷	222,57±14,50	395,91±5,32	138,82±4,99
10 ⁻⁸	224,20±4,50*	373,79±7,02	128,78±5,99*

Примечание: * – статистически достоверные изменения, $P \leq 0,05$.

Особенности имело и влияние перечисленных соединений на активность *папаина*. Здесь добавление к протеиназе *пара*-гидроксибензилидена пинаколина и ванилиден камфоры в концентрации 10^{-3} – 10^{-8} М сопровождалось ростом желатинолитической активности на 18–40%. Несколько слабее было действие гесперидина: в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-8} М прирост активности папаина составил 16–24%. Нужно отметить, что угнетение активности этой Следует на 19–20% вызвал лишь зингерон в минимальных концентрациях. Остальные соединения на активность папаина существенного влияния не оказали.

Причины отсутствия ингибиторного эффекта изучаемых соединений на активность вышеупомянутых трех протеиназ, на наш взгляд, могут состоять в следующем.

Большинство этих соединений за исключением гесперидина и гисперитина являются монофенольными.

Ранее нами было показано, что каталитическая функция пепсина и папаина реализуется с участием супероксидного радикала и блокируется перехватчиками последнего [13]. Для α -химотрипсина ситуация несколько иная: перехватчики O_2^{\cdot} эффективны лишь при лабильзации структуры молекулы энзима мочевиной и только в начальный период протеолитического действия [14]. Активаторная функция стрептокиназы, имеющая полностью O_2^{\cdot} -зависимый характер, нечувствительна к ряду монофенольных соединений (тироzinу, гидрохинону, пирокатехину, серотонину), фенолом она подавляется на 28% при концентрации эффектора 0,3 М, и лишь полифенольные диазотированные лигнины блокировали ее, как и активность пепсина и папаина, полностью или на 60% в зависимости от характера образца эффектора при концентрации 10^{-3} – $5 \cdot 10^{-3}$ М [15].

Использованные соединения являются гидрофобными. Нами было показано, что замещение воды этанолом на 40–50% (как и в настоящем эксперименте) не оказывает влияние на активность α -химотрипсина, но ведет к увеличению фибринолитической активности пепсина и папаина на 20–35% [16]. Замещение же воды диметилсульфоксидом на 50% также не отражается существенно на активности α -химотрипсина, но увеличивает фибринолитическую активность пепсина на 30% и подавляет таковую папаина на 60% [17]. Следовательно, растворитель органического характера может вносить заметный интерферирующий вклад в реализации эффекта соединений.

Заключение

Сопоставляя полученные результаты с данными литературы представляется целесообразным вести дальнейшие изыскания ингибиторов пепсина, папаина и α -химотрипсина, учитывая O_2^{\cdot} -зависимый характер их действия, в направлении создания водорастворимых полифенольных соединений. Это впервые было продемонстрировано нами в 1990 году [15, 17] и нашло выражение в создании полифенольных ингибиторов аспартильной протеиназы вируса иммунодефицита человека [18].

Список цитированных источников

- 1 Zephyr, J. Viral proteases: structure, mechanism and inhibition / J. Zephyr, Y. N. Kurt, C. A. Schiffer // *Enzymes*. – 2021. – Vol. 50. – P. 301–333. DOI: 10.1016/bs.enz.2021.09.004.
- 2 Бореко, Е. И. Синтетические соединения, медикаменты и природные продукты с противовирусными свойствами / Е. И. Бореко. – Минск : Колорград, 2021. – 272 с.
- 3 Alterman, M. Design and synthesis of HIV-1 protease inhibitors / M. Alterman // *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala*, 2001. – 70 p.
- 4 Prejdova, J. Determining and overcoming resistance to HIV protease inhibitors / J. Prejdova, M. Soucek, J. Konvalinka // *Current Drug Targets Infectious Disorders*. – 2004. – Vol. 4, № 2. – P. 137–152. DOI: 10.2174/1568005043340984.
- 5 Coronavirus papain-like proteases negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated signaling / L. Sun [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, № 2: e30802. DOI: 10.1371/journal.pone.0030802.
- 6 Sternberg, A. Novel drugs targeting the SARS-CoV-2/COVID-19 machinery / A. Sternberg, D. L. McKee, C. Naujokat // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2020. – Vol. 20, № 16. – P. 1423–1433. DOI: 10.2174/1568026620999200517043137
- 7 Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs / K. Anand [et al.] // *Science*. – 2003. – Vol. 300, № 5626. – P. 1763–1767. DOI: 10.1126/science.1085658
- 8 Singh, K. P. Pepsin assay one of the easiest approach for prescreening of hiv-protease inhibitors / K. P. Singh, A. Kumar, R. Prasad // *J. of pharmaceutical and scientific innovation*. – 2013. – Vol. 2, № 1. – P. 53–56.
- 9 Коваленко, В. Н. Селективный метод гидрирования сопряженных ненасыщенных кетонов с гидроксикарильным заместителем в β -положении / В. Н. Коваленко, А. С. Пратько // *Журн. орг. химии*. – 2017. – Т. 53, вып. 1. – С. 31–35.
- 10 Seitz, C. T. An improved conversion of hesperidin into hesperetin including purity determination by gradient-elution, high-pressure liquid chromatography / C. T. Seitz, R. E. Wingard Jr. // *J. Agric. Food Chem.* – 1978. – Vol. 26, № 1. – P. 278–280. DOI: 10.1021/jf60215a075
- 11 Методы исследований : учеб. пособие / Е. В. Барковский [и др.] ; под ред. А. А. Чиркина. – Минск : Выш. шк., 2013. – Гл. 5. – С. 132–157.
- 12 Синтез модифицированных фрагментов фибриногена и их влияние на активность протеолитических ферментов / В. Н. Никандров [и др.] // *Биоорг. химия*. – 2006. – Т. 32, № 2. – С. 144–150.

- 13 Nikandrov, V. N. Some unusual manifestation of proteolysis / V. N. Nikandrov, N. S. Pyzhova // *Cellular and Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 52, № 4. – P. 30–39.
- 14 Никандров, В. Н. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук.* – 2008. – № 1. – С. 4–23.
- 15 Никандров, В. Н. Воздействие оксидоредуктантов на протеолизические процессы *in vitro* / В. Н. Никандров, Н. С. Пыжова // *Вестн. Палес. дярж. ун-та. Сер. прыродазн. навук.* – 2019 – № 1. – С. 12–28.
- 16 Pyzhova, N. S. Effect of active oxygen species scavengers on fibrinolytic activity of some proteinases / N. S. Pyzhova, V. N. Nikandrov // *Thrombosis Research*. – 1996. – Vol. 88, № 4. – P. 303–312.
- 17 Пыжова, Н. С. Участие активных форм кислорода в процессах протеолиза: ... дис. канд. биол. наук: 03.00.04 / Н. С. Пыжова. – Минск, 1990.
- 18 Design and development of highly potent HIV-1 protease inhibitors with a crown-like oxotricyclic core as the P2-ligand to combat multidrug-resistant HIV variants / A. K. Ghosh [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 60, № 10. – P. 4267–4278. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00172
- 9 Kovalenko VN, Prat'ko AS. Selektivnyj metod gidrirovaniya sopryazhennyh nenasyshchennyh ketonov s gidroksiaril'nyim zamestitel'em v β -polozhenii [Selective hydrogenation of conjugated unsaturated ketones containing a hydroxyaryl substituent in the β -position]. *Zhurnal organicheskoy himii* [Journal of Organic Chemistry], 2017, vol. 53, iss. 1, pp. 31–35. (In Russian)
- 10 Seitz CT, Wingard RE. Jr. An improved conversion of hesperidin into hesperetin including purity determination by gradient-elution, high-pressure liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, vol. 26, no. 1, pp. 278–280. DOI: 10.1021/jf60215a075
- 11 Nikandrov VN, Pyzhova NS. Metody issledovaniya proteoliza. [Methods for the study of proteolysis]. *Sovremennye problemy biokhimii. Metody issledovaniya* [Modern problems of biochemistry. Research methods]. Minsk, Vysheishaia shkola Publ., 2013, pp. 132–157. (In Russian)
- 12 Nikandrov VN, Pyzhova NS, Golubovich VP, Mel'nik OV, Martinovich VP. Sintez modifitsirovannykh fragmentov fibrinogena i ih vliyanie na aktivnost' proteoliticheskikh fermentov [Synthesis of modified fragments of fibrinogen and their effect on the activity of proteolytic enzymes]. *Bioorganicheskaya himiya* [Bioorganic Chemistry], 2006, vol. 32, no. 2, pp. 144–150. (In Russian)
- 13 Nikandrov VN, Pyzhova NS. Some unusual manifestation of proteolysis. *Cellular and Molecular Biology*, 2006. Vol. 52, no. 4. pp. 30–39.
- 14 Nikandrov VN, Pyzhova NS. Proteoliz kak universalnyy mekhanizm regulatsii biokhimicheskikh i biologicheskikh protsessov. Diskussionnyye aspekty [Proteolysis as a universal mechanism of regulation of biochemical and biological processes. Discussion aspects]. *Izvestiya natsionalnoy akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskih nauk* [News of the National Academy of Sciences of Belarus. Series: Medical Sciences]. 2008, no. 1, pp. 4–22. (In Russian).
- 15 Nikandrov VN, Pyzhova NS. Vozdejstvie oksidoreduktantov na proteoliticheskie processy in vitro [Effect of oxidoreductants on proteolytic processes in vitro]. *Vesnik Paleskaga dzyarzhavnaga universiteta. Seryya pryrodaznauchykh navuk* [Bulletin of Polesky State University. Series in natural sciences], 2019, no. 1, pp. 12–28. (In Russian)
- 16 Pyzhova NS, Nikandrov VN, Effect of active oxygen species scavengers on fibrinolytic activity of some proteinases. *Thrombosis Research*, 1996, vol. 88, no. 4, pp. 303–312.
- 17 Pyzhova NS. Uchastie aktivnykh form kisloroda v protsessah proteoliza [Participation of reactive oxygen species in the process of proteolysis]. Cand. sci. diss. Minsk, 1990, p. 193. (In Russian)
- 18 Ghosh AK, Rao KV, Nyalapatla PR, Osswald HL, Martyr CD, Aoki M, Hayashi H, Agniswamy J, Wang Y-F, Bulut H, Das D, Weber IT, Mitsuya H. Design and development of highly potent HIV-1 protease inhibitors with a crown-like oxotricyclic core as the P2-ligand to combat multidrug-resistant HIV variants. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 60, no. 10, pp.4267–4278. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00172

References

- 1 Zephyr J, Kurt YN, Schiffer CA. Viral proteases: structure, mechanism and inhibition. *Enzymes*, 2021, vol. 50, pp. 301–333. DOI: 10.1016/bs.enz.2021.09.004.
- 2 Boreko EI. Sinteticheskie soedineniya, medikamenty i prirodnye produkty s protivovirusnymi svoystvami [Synthetic compounds, drugs and natural products with antiviral properties]. Minsk, Kolorgrad, 2021, 272 p. (In Russian)
- 3 Alterman M. Design and synthesis of HIV-1 protease inhibitors. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala*, 2001, 70 p.
- 4 Prejdova J, Soucek M, Konvalinka J. Determining and overcoming resistance to HIV protease inhibitors. *Current Drug Targets Infectious Disorders*, 2004, vol 4, no. 2, pp. 137–152. DOI: 10.2174/1568005043340984.
- 5 Sun L, Xing Y, Chen X, Zheng Y, Yang Y, Nichols DB, Clementz MA, Banach BS, Li K, Baker SC, Chen Z. Coronavirus papain-like proteases negatively regulate antiviral innate immune response through disruption of STING-mediated signaling. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 2, e30802. DOI: 10.1371/journal.pone.0030802.
- 6 Sternberg A, McKee DL, Naujokat C. Novel Drugs Targeting the SARS-CoV-2/COVID-19 Machinery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2020, vol. 20, no. 16, pp. 1423–1433. DOI: 10.2174/1568026620999200517043137
- 7 Anand K, Ziebuhr J, Wadhvani P, Mesters JR, Hilgenfeld R. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs. *Science*, 2003, vol. 300, no. 5626, pp. 1763–1767. DOI: 10.1126/science.1085658
- 8 Singh KP, Kumar A, Prasad R. Pepsin assay one of the easiest approach for prescreening of hiv-protease inhibitors. *Journal of pharmaceutical and scientific innovation*, 2013, vol. 2, no. 1, pp. 53–56.

EFFECT OF PHENYLPROPANOID KETONES ON ACTIVITY OF THE PROTEINASES

V.N. Nikandrov¹, I.A. Ilyuchyk¹, V.N. Kovalenko², V.A. Yatsushkevich¹

¹Polessky State University, Pinsk, Republic of Belarus

²Belarusian State Pedagogical University, Minsk, Republic of Belarus

Background. For the efficient reproduction of a number of viruses, including the human immunodeficiency virus and coronaviruses, the function of their inherent proteinases, in particular, those close to pepsin, α -chymotrypsin-like and papain-like, is important, which necessitates the search for effective inhibitors of these enzymes.

Objective. To reveal the features of the action of a number of compounds of phenylpropane ketones on the activity of pepsin, α -chymotrypsin and papain.

Material and Methods. The activity of purified proteinase samples was determined by the method of gelatin lysis in a agar gel thin layer with the addition of synthesized phenylpropane ketones.

Results. The addition of zingerone (10^{-3} – 10^{-5} M), hesperidin, and para-hydroxybenzyl camphor (10^{-2} – 10^{-8} M), camphor (10^{-3} M) to pepsin increased gelatin degradation by 27–35, 22–48 and 25% respectively. The effect of raspberry ketone (10^{-3} – 10^{-8} M) did not exceed 17%. A weak inhibitory effect, 13–25%, was caused by the addition of p-hydroxybenzyl pinacolin and vaniliden verbenone (10^{-2} – 10^{-7} M) to the enzyme.

The gelatinolytic activity of α -chymotrypsin increased by 11–23% with the hesperetin (10^{-3} – 10^{-7} M) addition; in the p-hydroxybenzylidene pinacolin (10^{-3} – 10^{-8} M) presence fluctuations were noted: an increase in proteinase activity by 20–25% and its decrease by 20–26%.

The addition of para-hydroxybenzylidene pinacolin, vaniliden camphor (10^{-3} – 10^{-8} M), and hesperidin (10^{-4} – 10^{-8} M) to papain led to an increase in gelatin cleavage by 18–40 and 16–24%, respectively. The inhibition of the activity of this proteinase by 19–20% was caused by zingerone in minimal concentrations.

Conclusions. Comparing the obtained results with literature data, it seems appropriate to conduct further research on inhibitors of pepsin, papain and α -chymotrypsin, taking into account the O_2 '-dependent nature of their action, towards the creation of water-soluble polyphenolic compounds.

Keywords: pepsin, α -chymotrypsin, papain, proteolytic activity, phenylpropane ketones.

Поступила 29.08.2022