

Пригнічення мітохондріального шляху синтезу сірководню погіршує скоротливу функцію серця та підвищує чутливість мітохондріальної пори до Ca^{2+} у серці щурів

А.Ю. Лучкова, Ю.В. Гошовська, Р.А. Федічкіна, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця, НАН України, Київ; e-mail: a.luchkova@biph.kiev.ua

Встановлено участь сірководню, що синтезується мітохондріальним ферментом 3-меркаптопіруватсульфуртрансферазою (3-MST), у стійкості серця до кальцієвих навантажень та регуляції неспецифічної мітохондріальної пори (МП). В експериментах на ізольованому серці показано, що пригнічення цього ферменту його інгібітором О-карбоксиметилгідроксиламіном (О-СМН), який застосовували у дозі 50 мг/кг, призводило до погіршення всіх вихідних показників роботи серця. Тиск, що розвивається у лівому шлуночку, а також швидкість скорочення і розслаблення міокарда знижувалися на 50 %. При відтворенні моделі кальцієвого навантаження О-СМН викликав швидке підвищення кінцевого діастолічного тиску та появу аритмій. Встановлено, що одним з механізмів такого впливу інгібітора in vivo є підвищення чутливості МП до кальцію та значне зростання амплітуди набухання мітохондрій на тлі дії іона у концентрації 10^{-4} моль/л. В експериментах in vitro на ізольованих мітохондріях показано дозозалежний вплив О-СМН на Ca^{2+} -індуковане набухання органел у серці щурів. У концентрації 10^{-3} моль/л він підвищував амплітуду набухання мітохондрій на тлі дії кальцію на 44 %. Отже, виявлено, що ендогенний сірководень мітохондріального походження бере участь у регуляції відкриття МП, а також відіграє важливу роль у регуляції роботи серця. Ключові слова: сірководень; кальцій; мітохондріальна пора; 3-меркаптопіруватсульфуртрансфераза; мітохондрії; серце.

ВСТУП

Активне дослідження механізмів синтезу сірководню та його функцій у серцево-судинній системі дало змогу зрозуміти, що цей синтез є тканинспецифічним. Так, у мозку ссавців, зокрема в гіпокампі, мозочку та півкулях головного мозку за продукцію H_2S відповідає фермент цистатіонін- β -синтаза (CBS), тоді як в аорті, клубовій кишці, ворітній вені, печінці, нирках та матці його утворення відбувається переважно цистатіонін- γ -ліазою (CSE) [1]. На мишах з нокаутованим геном ферменту CBS, було відкрито інший шлях синтезу газотрансмітера, а саме за допомогою 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази (3-MST), яка працює в парі з цистеїнами-

нотрансферазою (CAT) і має цитоплазматичну та мітохондріальну локалізацію [1]. Ген ферменту 3-MST експресується також у клітинах ендотелію та гладеньких м'язів судин [2]. Раніше вважалося, що ензим CSE відповідає за синтез H_2S у серці та судинах. Проте нещодавно стало відомо, що саме 3-MST є основним ферментом синтезу сірководню в коронарних артеріях серця [3]. Тому ми припустили, що H_2S мітохондріального походження бере активну участь у регуляції функцій серця та судин.

Основною умовою роботи серцевого м'яза є коливання внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у кардіоміоцитах, оскільки цей катіон забезпечує спряження процесів збудження і скорочення клітин міокарда. Під

© А.Ю. Лучкова, Ю.В. Гошовська, Р.А. Федічкіна, Н.А. Струтинська, В.Ф. Сагач

час фази деполяризації кальцій входить у кардіоміоцити через потенціалзалежні кальцієві канали L-типу і запускає відкриття ріанодинових рецепторів саркоплазматичного ретикулума 2-го типу (RYR) [4]. У результаті такого кальційіндукованого вивільнення кальцію (CICR) в цитоплазмі зростає його концентрація та індукується скорочення клітини. Надалі розслаблення виникає за умов зниження концентрації Ca^{2+} в цитозолі за рахунок функціонування Ca^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулума та сарколеми, Na^+ - Ca^{2+} -обмінника та акумуляції кальцію мітохондріями [4]. Останні ж не лише відіграють роль депо цього катіона, а й потребують його для фізіологічного функціонування, оскільки він стимулює окисне фосфорилування та синтез АТФ, активуючи дегідрогенази циклу трикарбонових кислот [5]. З іншого боку, перевантаження мітохондрій кальцієм викликає відкриття циклоспоринчутливої мітохондріальної пори перемінної проникності (МП), що є пусковим механізмом у розвитку апоптозу [6]. Отже, регуляція кальцієвого гомеостазу в кардіоміоцитах є важливою темою дослідження і сірководень може відігравати в цьому процесі одну з ключових ролей. Особливе значення може мати саме H_2S мітохондріального походження.

Мета нашої роботи – дослідження участі сірководню, утвореного в мітохондріях ферментом 3-MST, у чутливості МП до індуктора кальцію та у здатності серця витримувати кальцієві навантаження.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на ізольованих серцях самців щурів лінії Вістар (250-300 г) та на мітохондріях з тканин серця. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію і використовували в експериментах, дотримуючись вимог Європейської конвенції при роботі з експериментальними тваринами (Страсбург, 1986). Перфузію коронарних судин ізольованого серця здійснювали ретроградно в умовах

постійного тиску (75-80 мм рт. ст.) при 37 °С розчином Кребса-Хензеляйта такого складу (ммоль/л): NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO_4 – 1,2; NaHCO_3 – 24; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; CaCl_2 – 1,7, який безперервно аерували карбогеном (95% O_2 і 5% CO_2). Методика навантаження ізольованого серця кальцієм передбачала додавання CaCl_2 у перфузійний розчин кожні 10 хв, концентрація якого зростала від 1,7 до 12,5 ммоль/л. За таких умов вивчали зміни показників скоротливої активності ізольованого серця на тлі блокади ферменту синтезу сірководню 3-MST інгібітором O-карбоксиметилгідроксиламіном (O-CMH, 50 мг/кг), який вводили внутрішньоочеревинно за 30 хв до початку експерименту. Як контроль використовували серця нативних тварин.

Тиск у порожнині лівого шлуночка ($P_{\text{лшл}}$) та його першу похідну (dP/dt_{max} і dP/dt_{min}), кінцевий діастолічний тиск (КДТ) та частоту серцевих скорочень (ЧСС) вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиком 746 («Мінгограф-82», «Eleva», Швеція) і реєстрували на комп'ютері, використовуючи програмне забезпечення Global Lab. Значення коронарного потоку (КП) оцінювали як об'єм перфузійного розчину, який відтікав від серця за 1 хв. Інтенсивність скоротливої функції (ІСФ) розраховували як добуток тиску на ЧСС. Достовірність змін визначали за допомогою критерію t Стьюдента.

Виділення мітохондрій здійснювали методом диференційного центрифугування у нашій модифікації [8]. Для цього серця тварин ретельно промивали охолодженим 0,9 %-м розчином KCl (2-4°C), подрібнювали та гомогенізували у 9-кратному об'ємі середовища (ммоль/л): сахароза – 250, тріс- HCl – 25, ЕГТА – 1; рН 7,2-7,4. Гомогенат центрифугували двічі за 700 і 11000g (4°C). Отриманий осад (мітохондріальна фракція) ресуспендували в буфері (ммоль/л): сахароза – 250, тріс- HCl – 25; рН 7,2-7,4, і одразу використовували в дослідах. Одержану суспензію мітохондрій зберігали при 2 °С. Концентра-

цію білка в суспензії мітохондрій визначали за методом Лоурі [9].

Для дослідження відкривання МП ізольовані органели поміщали в інкубаційне середовище ізотонічного складу (кінцевий об'єм – 3 мл) і за допомогою спектрофотометра реєстрували зниження оптичної щільності при $\lambda=520$ нм протягом 15 хв. Концентрація білка становила 0,4 мг/мл. Як контроль використовували суспензію нативних мітохондрій в інкубаційному середовищі за відсутності індуктора МП – Ca^{2+} . В експериментах досліджували дію О-СМН у діапазоні концентрацій 10^{-3} - 10^{-5} моль/л. У кожній серії дослідів було використано не менше ніж 5 тварин. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програм MS Excel, OriginPro 7.5.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виявлено, що пригнічення мітохондріального фермента синтезу сірководню 3-MST при дії О-СМН негативно впливало на вихідні показники кардіодинаміки ізольованого серця дорослих шурів (таблиця). Так, удвічі знижувалися $P_{\text{дшл}}$, dP/dt , а коронарний потік зменшувався на 11,8 %. Спостережувані зміни були вірогідними. Незважаючи на те, що ЧСС мала тенденцію до зростання, робота серця (ІСФ) у тварин після введення блокатора 3-MST залишалася вдвічі нижчою, ніж у інтактних шурів.

Раніше нами було показано, що екзогенне введення донора сірководню (NaHS) має позитивний ефект на гетерометричну регуляцію роботи ізольованого серця шурів, а також запобігає розвитку реперфузійних порушень скоротливої активності міокарда, що пов'язані із його переважанням кальцієм [10]. Крім того було виявлено, що однією з мішеней кардіопротекторної дії донора сірководню є МП перемінної проникності [11], яка бере участь у запуску апоптозу/некрозу і розвитку різноманітних захворювань серцево-судинної системи [6]. Це спонукало нас зробити висновок про регуляторний вплив сірководню на кальцієвий обмін у клітинах кардіоміоцитів.

Послідовно збільшуючи концентрацію CaCl_2 у перфузійному розчині і відтворюючи таким чином модель кальцієвого навантаження, досліджували адаптаційні можливості міокарда у тварин з пригніченим синтезом сірководню. Показано, що серця дослідних тварин розвивали менш потужну реакцію, яка проявлялась у знижених значеннях $P_{\text{дшл}}$, скорочувальної активності, КП та ІСФ міокарда (рис. 1). Також слід зазначити, що максимальна інотропна стимуляція серця у контрольних тварин спостерігалася у відповідь на додавання 7,5 ммоль/л CaCl_2 , тоді як у дослідних – на 5 ммоль/л CaCl_2 (див. рис. 1, г), що свідчить про зниження функціональних резервів міокарда у тварин

Таблиця. Вплив інгібітора фермента 3-меркаптопіруватсульфуртрансферази на показники кардіодинаміки ізольованого серця шурів ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=6)	О-карбоксиметилгідроксиламін (n=5)
Тиск у лівому шлуночку, мм рт. ст.	107 ± 10	48 ± 6**
Максимальна швидкість скорочення, мм рт. ст./с	2043 ± 194	968 ± 107*
Максимальна швидкість розслаблення, мм рт. ст./с	1887 ± 202	920 ± 115*
Коронарний потік, мл/хв	7,6 ± 0,3	6,7 ± 0,2*
Частота серцевих скорочень хв^{-1}	200 ± 13	217 ± 13
Інтенсивність скоротливої функції, мм рт. ст. хв^{-1}	22434 ± 3021	11671 ± 1754*

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ відносно контролю

з пригніченим мітохондріальним ферментом синтезу сірководню.

Як відомо, внаслідок перевантаження внутрішнього вмісту клітини кальцієм, його концентрація зростає у саркоплазматичному ретикулумі, цитоплазмі та мітохондріях. Це призводить до електричних та механічних порушень у роботі серця, зокрема до аритмій, зниження скоротливої функції, розвитку контрактур та післяконтрактур [12]. Водночас зниження скоротливої сили пов'язане зі зменшенням кількості високоенергетичних

фосфатів. Таке зростання концентрації Ca^{2+} в клітинах серця може бути наслідком пролонгованої тахікардії, підвищеним вивільненням катехоламінів, порушенням функцій клітин (у результаті ішемії, гіпоксії, реперфузії, серцевої недостатності) [12].

Отже, пригнічення синтезу сірководню в клітинах серця щура призводить до зниження здатності серця витримувати кальцієві навантаження. Оскільки раніше було показано, що за різних патологічних станів, зокрема при старінні та гіпертензії, вміст H_2S в тканинах

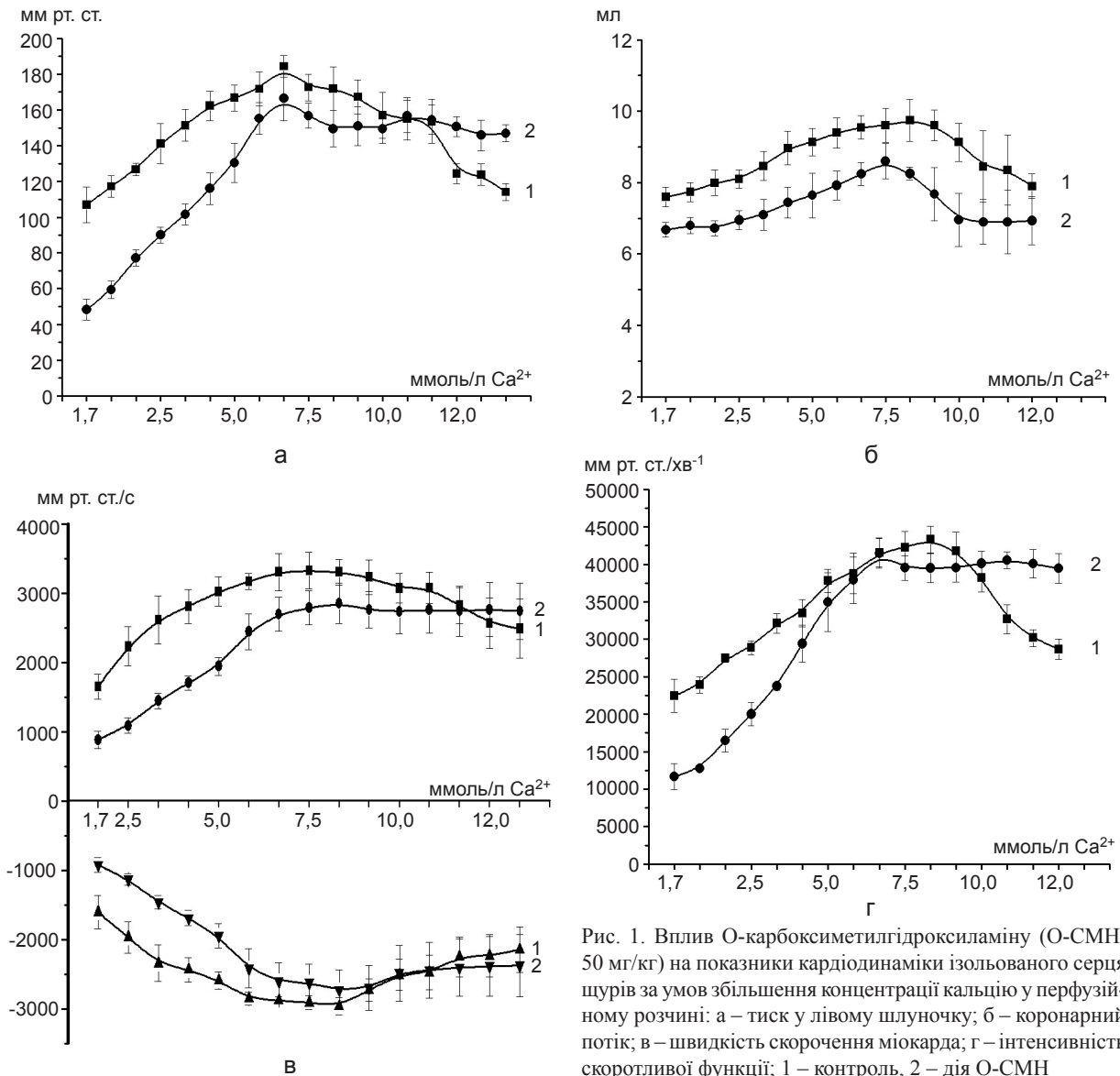


Рис. 1. Вплив О-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН; 50 мг/кг) на показники кардіодинаміки ізолюваного серця щурів за умов збільшення концентрації кальцію у перфузійному розчині: а – тиск у лівому шлуночку; б – коронарний потік; в – швидкість скорочення міокарда; г – інтенсивність скоротливої функції; 1 – контроль, 2 – дія О-СМН

серця та мітохондріях знижується, а відтак серце стає більш чутливим до ішемічно-реперфузійного пошкодження [13].

Окрім того, що Ca^{2+} регулює перебіг циклу Кребса та є активатором низки інших ферментів, у високій концентрації – це природний індуктор відкриття МП перемінної проникності [14]. У попередніх дослідженнях було виявлено, що донор сірководню NaHS, внесений екзогенно у концентрації 10^{-5} моль/л, попереджає відкриття МП, що проявлялося у зниженні набухання органел на тлі дії кальцію порівняно з таким у контрольних тварин [15]. Тому ми припустили, що одним з механізмів послаблення стійкості серця до кальцієвих навантажень при інгібуванні мітохондріального шляху синтезу H_2S є саме відкриття МП. На рис. 2, а показано вплив О-СМН *in vivo* на чутливість МП до Ca^{2+} . Встановлено, що дефіцит H_2S мітохондріального походження спричиняє значне зниження порога чутливості до кальцію та значного підвищення амплітуди набухання мітохондрій за його дії у концентрації 10^{-4} моль/л. У експериментах *in vitro* з використанням цього інгібітора виявлено, що його вплив на набухання мітохондрій залежав від

концентрації (див. рис. 2,б). Найбільш активно, на 44 %, О-СМН підвищував амплітуду набухання мітохондрій у концентрації 10^{-3} моль/л. За дії нижчих концентрацій (10^{-4} та 10^{-5} моль/л) вона збільшилася всього на 20 та 17,8 % відповідно.

Таким чином, пригнічення ферменту мітохондріального синтезу сірководню збільшує чутливість мітохондрій серця до дії Ca^{2+} , що призводить до їх набухання, а також до погіршення здатності міокарда регулювати кальцієвий метаболізм за умов переваження катіоном. Це може бути однією із фізіологічних ролей сірководню, що синтезується в мітохондріях ферментом 3-MST.

ВИСНОВКИ

1. Пригнічення мітохондріального ферменту синтезу сірководню 3-MST знижувало вихідні показники кардіодинаміки у дорослих щурів, зокрема $P_{\text{лшл}}$, dP/dt_{max} і dP/dt_{min} та КП.

2. Введення інгібітора *in vivo* призводило до зменшення функціональних резервів міокарда, що проявлялося у розвитку максимальної сили скорочення міокарда за нижчої концентрації кальцію у середовищі, порівняно-

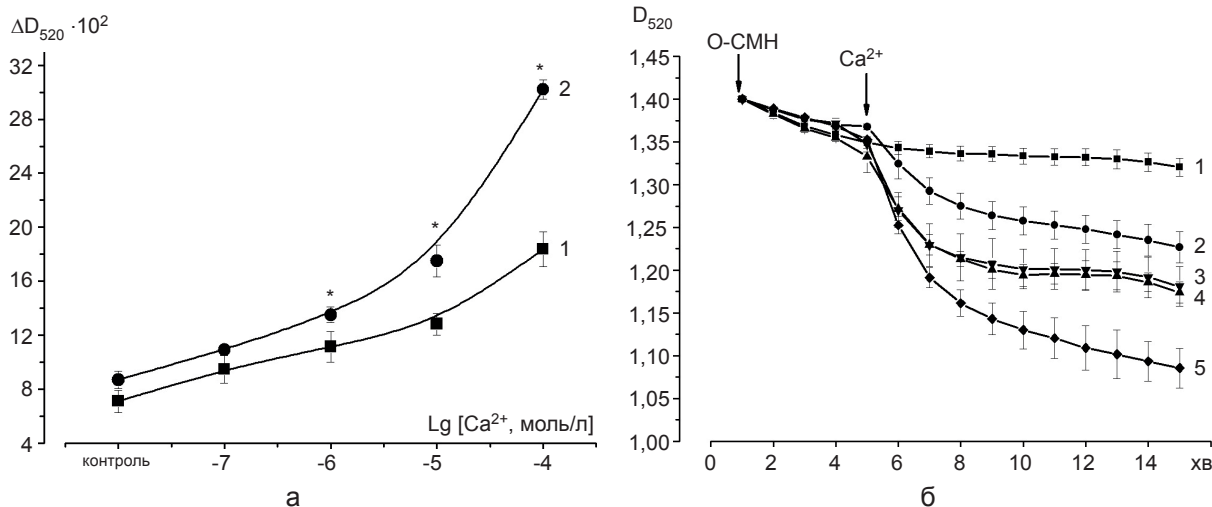


Рис. 2. Вплив О-карбоксиметилгідроксиламіну (О-СМН) на динаміку набухання мітохондрій: а – зміни чутливості мітохондріальної пори (МП) серця до різних концентрацій іонів кальцію у середовищі: 1 – контроль, 2 – дія *in vivo* О-СМН (50 мг/кг); б – зміни амплітуди набухання суспензії мітохондрій у серці щурів: 1 – безкальцієве середовище, 2 – дія Ca^{2+} (10^{-4} моль/л), 3-5 – преінкубація з О-СМН (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} моль/л відповідно) і дія Ca^{2+} . * $P < 0,05$ відносно контролю

но з контрольними тваринами.

3. Пригнічення ендогенного утворення H_2S *in vivo* знижувало поріг чутливості МП до Ca^{2+} та підвищувало амплітуду набухання на 39 % при дії кальцію у концентрації 10^{-4} моль/л.

4. Вплив О-СМН *in vitro* був дозозалежним, при цьому найбільш токсичною виявилася концентрація інгібітора 10^{-3} моль/л, яка підвищувала амплітуду набухання мітохондрій на 44 % на тлі дії Ca^{2+} (10^{-4} моль/л).

**А.Ю. Лучкова, Ю.В. Гошовская,
Р.А. Федичкина, Н.А. Струтинская, В.Ф. Сагач**

УГНЕТЕНИЕ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПУТИ СИНТЕЗА СЕРОВОДОРОДА УХУДШАЕТ СОКРАТИТЕЛЬНУЮ ФУНКЦИЮ СЕРДЦА И ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ПОРЫ К Ca^{2+} В СЕРДЦЕ КРЫС

Установлено участие сероводорода, синтезируемого митохондриальным ферментом 3-меркаптопируватсульфуртрансферазой (3-MST), в устойчивости сердца к кальциевым нагрузкам и регуляции неспецифической митохондриальной поры (МП). В экспериментах на изолированном сердце показано, что подавление этого фермента его ингибитором О-карбоксиметилгидроксиламином (О-СМН) в дозе 50 мг/кг приводило к ухудшению всех исходных показателей работы сердца. Давление, развиваемое в левом желудочке, а также скорость сокращения и расслабления миокарда снижались на 50 %. При воспроизведении модели кальциевых нагрузок ингибитор О-СМН вызывал быстрое повышение конечного диастолического давления и появление аритмий. Установлено, что одним из механизмов такого влияния ингибитора *in vivo* является увеличение чувствительности МП к кальцию и значительный рост амплитуды набухания митохондрий на фоне действия иона в концентрации 10^{-4} моль/л. В экспериментах *in vitro* на изолированных митохондриях обнаружено дозозависимый эффект О-СМН на Ca^{2+} -индуцированное набухание органелл в сердце крыс. Было показано, что О-СМН в концентрации 10^{-3} моль/л повышал амплитуду набухания митохондрий на фоне действия кальция на 44 %. Итак, установлено, что эндогенный сероводород митохондриального происхождения участвует в регуляции открывания МП, а также играет важную роль в регуляции работы сердца.

Ключевые слова: сероводород; кальций; митохондриальная пора; 3-меркаптопируватсульфуртрансфераза; митохондрии; сердце.

**A.Yu. Luchkova, Yu.V. Hoshovska,
R.A. Fedichkina, N.A. Strutynska, V.F. Sagach**

INHIBITION OF MITOCHONDRIAL H_2S SYNTHESIS DEPRESSES HEART FUNCTION AND INCREASES SENSITIVITY OF MITOCHONDRIAL PORE TO CALCIUM LOAD

The present study was aimed to investigate the effect of O-carboxymethyl hydroxylamine (O-CMH) on heart function in conditions of Ca^{2+} loads and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) opening in cardiac mitochondria. O-CMH (50 mg per kg) was dissolved in physiological solution and injected intraperitoneally 30 min before the experiment. Rat isolated hearts were Langendorf-perfused and subjected to increased concentration of Ca^{2+} in perfusion solution ranged from 1.7 to 12.5 mmol/L. The heart function was assessed by measuring the LVDP, dP/dt, the coronary flow, the heart rate. The opening of MPTP was estimated by monitoring Ca^{2+} induced mitochondria swelling at 520 nm. The results showed that pretreatment with O-CMH significantly depressed the initial contractile activity of the isolated rat hearts and the coronary flow. Further modeling of Ca^{2+} loads was accompanied with lower increment of LVDP and dP/dt comparing to control rats indicating decreased functional reserves and low effectiveness of Ca^{2+} management in O-CMH pretreated rats. Additionally, cardiac mitochondria in O-CMH group were more sensitive to Ca^{2+} showing maximum swelling at 10^{-5} moles/L in the incubation medium vs 10^{-4} moles/L in control group ($p < 0.05$). Pre-incubation of cardiac mitochondria with O-CMH in concentration of 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} moles/L led to increased Ca^{2+} induced swelling by 17.8, 20 and 44% respectively. Thus, we have found that inhibition of mitochondrial H_2S synthesis pathway increase sensitivity of cardiac mitochondria to Ca^{2+} that lead to mitochondrial swelling and decreased ability of myocardium to manage Ca^{2+} homeostasis by cardiomyocytes in conditions of Ca^{2+} load. This might be proposed as the physiological role of H_2S synthesized in mitochondria by 3-MPST.

Key words: hydrogen sulfide; calcium; MPTP; MPST; mitochondria; heart.

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine;
e-mail: a.luchkova@biph.kiev.ua*

REFERENCES

1. Guo W, Kan J, Cheng Z, Chen J, Shen Y, Xu J, Wu D, Zhu Y. Hydrogen Sulfide as an Endogenous Modulator in Mitochondria and Mitochondria Dysfunction. *Ox Med and Cell Long*. 2012; 1-9.
2. Olson KR. The therapeutic potential of hydrogen sulfide: separating hype from hope. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011; 301:297-312.
3. Kuo MM, Kim DH, Jandu S, Bergman Y, Tan S, Wang H, Pandey DR, Abraham TP, Shoukas AA, Berkowitz

- DE, Santhanam L. MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016; 310:H71-9
4. Dedkova EN, Blatter LA. Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell Calcium*. 2008; 44:77-91.
 5. Glancy B, Balaban RS. Role of Mitochondrial Ca²⁺ in the Regulation of Cellular Energetics. *Biochemistry*. 2012; 51:2959-73.
 6. Halestrap AP, Pasdois Ph. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1787:1402-15.
 7. Sagach VF, Shimanskaya TV, Nadtochiy SM. Factor that is released during the reperfusion of ischemic heart can be a marker of mitochondrial pore opening. *Fiziol Zh*. 2003; 49(4):6-12. [Ukrainian].
 8. Sagach VF, Vavilova GL, Strutyns'ka NA, Rudyk OV. The aging increase in the sensitivity of the mitochondrial permeability transition pore opening to inductors in rat heart. *Fiziol Zh*. 2004; 50(2): 49-63. [Ukrainian].
 9. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; (1):265-75.
 10. Shymans'ka TV, Hoshovs'ka IuV, Semenikhina OM, Sahach VF. Effect of hydrogen sulfide on isolated rat heart reaction under volume load and ischemia-reperfusion]. *Fiziol Zh*. 2012; 58(6):57-66. [Ukrainian].
 11. Shimanskaia TV, Strutinskaia NA, Vavilova GL, Goshovskaia IuV, Semenikhina EN, SagachVF. Cyclosporin A-sensitive mitochondrial pore as a target of cardioprotective action of hydrogen sulfide donor. *Rus J of Physiol*. 2013 Feb; 99(2):261-72. [Russian].
 12. Vassalle M, Lin Ch-I. Calcium Overload and Cardiac Function. *J Biomed Sci*. 2004; 11:542-565.
 13. Strutynska NA, Kotsiuruba AV, Budko AYu, Mys LA, Sagach VF. Mitochondrial dysfunction in the aging heart is accompanied by constitutive NO-synthases uncoupling on the background of oxidative and nitrosative stress. *Fiziol Zh*. 2016; 62(2):3-11.
 14. Baumgartner HK, Gerasimenko JV, Thorne Ch, Ferdek P, et al. Calcium Elevation in Mitochondria Is the Main Ca²⁺ Requirement for Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening. *J of Biol Chem*. 2009; 284(31):20796-803.
 15. Strutynska NA, Semenykhina OM, Chorna SV, Vavilova GL, Sagach VF. Hydrogen sulfide inhibits Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition pore opening in adult and old rat heart. *Fiziol Zh*. 2011; 57(6):3-14. [Ukrainian].

*Матеріал надійшов
до редакції 20.04.2017*