

© Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА МЫШЕЙ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ ДОЗЫ ИЗАТИНА ИЛИ ДЕПРЕНИЛА

О.А. Бунеева¹, И.Г. Капица², Е.А. Иванова², А.Т. Копылов¹, В.Г. Згода¹, А.Е. Медведев^{1*}

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: professor57@yandex.ru

²Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный биологический регулятор, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных. Широкий спектр биологической активности изатина опосредуется изатин-связывающими белками, многие из которых были идентифицированы в ходе протеомного профилирования препаратов мозга мышей и крыс. Ряд этих белков имеет отношение к развитию нейродегенеративных заболеваний. В контексте нейропротекторного эффекта действие изатина сопоставимо с эффектами депренила (селегилина) – селективного механизм-активируемого ингибитора моноаминоксидазы Б (МАО Б) и известного фармакологического препарата, применяющегося для лечения болезни Паркинсона. В данной работе исследовано влияние однократного введения нейропротекторной дозы изатина (100 мг/кг) и депренила (10 мг/кг) на профиль изатин-связывающих белков мозга мышей. Протеомный анализ изатин-связывающих белков мозга мышей, которым однократно ввели изатин или депренил, позволил выявить репрезентативную группу белков ($n=200$), чувствительных к введению этих веществ. Изменение профиля изатин-связывающих белков, по-видимому, обусловлено накоплением изатина и депренила и их взаимодействием с белками-мишенями, препятствующим связыванию последних с аффинным сорбентом. В таком контексте идентифицированные изатин-связывающие белки мозга контрольных животных, которые при введении изатина или депренила перестают связываться с аффинным сорбентом (иммобилизованным аналогом изатина), очевидно, являются специфическими мишенями, непосредственно взаимодействующими с изатином (а также с депренилом) *in vivo*.

Ключевые слова: изатин-связывающие белки; изатин; депренил; мозг; протеомное профилирование

DOI: 10.18097/PBMC20196505407

ВВЕДЕНИЕ

Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный биологический регулятор, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных [1-5]. Интерес исследователей к этой “талантливой молекуле” [6] связан с потенциальным фармакологическим эффектом как самого изатина [1], так и его многочисленных аналогов [7-9]. Широкий спектр биологической активности изатина опосредуется многочисленными изатин-связывающими белками, многие из которых были идентифицированы в ходе протеомного профилирования препаратов мозга мышей и крыс [1, 10-12]. Физиологические концентрации изатина *in vitro* ингибируют моноаминоксидазу Б (МАО Б) и гуанилатциклазу рецепторов натрийуретических пептидов, более высокие (нейропротекторные) концентрации (50–400 мкМ) вызывают апоптоз различных (в том числе злокачественных) опухолей клеточных линий и влияют на экспрессию генов, связанных с апоптозом (см. обзор [1]). При введении *in vivo* изатин влияет на поведенческие реакции и ослабляет проявления паркинсонизма, индуцированного введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) [13-14].

В контексте нейропротекторного эффекта действие изатина сопоставимо с эффектами депренила (селегилина) – селективного механизм-активируемого

ингибитора МАО Б и известного фармакологического препарата, применяющегося для лечения болезни Паркинсона [15, 16]. Важно отметить, что нейропротекторное действие этих веществ при МФТП-индуцированном паркинсонизме, очевидно, связано не только с торможением активности МАО Б, приводящим к снижению метаболической активации МФТП и его превращению в нейротоксин 1-метил-4-пиридиния (МФП⁺). Депренил и изатин взаимодействуют с глицеральдегид-3-фосфатсфатдегидрогеназой (ГАФД) – ферментом гликолиза, которому свойственны негликолитические функции, имеющие отношение к развитию нейродегенеративной патологии [17-20]. При этом депренил снижает связывание с изатином другого полифункционального фермента гликолиза – пируваткиназы [21]. Последнее особенно интересно в контексте возможных конкурентных взаимоотношений между изатином и депренилом за связывание с определёнными белками-мишенями. Их анализ позволит лучше охарактеризовать существующие и потенциальные мишени для нейропротекторных препаратов.

Недавно проведённый протеомный анализ изатин-связывающих белков печени мышей, получавших в течение 21 дня внутрибрюшинные инъекции изатина (20 мг/кг) или депренила (1 мг/кг), позволил выявить репрезентативную группу белков ($n=30$), чувствительных к введению этих веществ [22].

Эти изатин-связывающие белки, обнаруженные только в печени intactных животных, по-видимому, являются специфическими мишенями, непосредственно взаимодействующими с изатином *in vivo* [22]. При длительном введении животным изатина или депренила они перестают связываться *in vitro* с иммобилизованным аналогом изатина, очевидно, из-за накопления этих веществ в печени и взаимодействия с белками-мишенями, которое препятствовало связыванию последних с аффинным сорбентом [22].

Целью настоящей работы было исследование профиля изатин-связывающих белков мозга мышей при однократном введении нейропротекторных доз изатина или депренила.

МЕТОДИКА

Реактивы

Бромциан-активированная сефароза 4В, изатин, дитиотреитол, йодацетамид, гидрокарбонат аммония, трипсин, трис(гидроксиметил)аминометан, гуанидин гидрохлорид, натрий хлористый, тритон X-100, ацетонитрил, кумасси бриллиантовый синий G-250 были получены от “Merck” (США); ацетат натрия, борная кислота, муравьиная кислота, тетраборат натрия, едкий натр – от “Acros Organics” (США); модифицированный трипсин (sequencing grade) – от “Promega” (США). Депренил (селегилин гидрохлорид) был получен от “Sigma-Aldrich” (США), а 5-аминоизатин был синтезирован при помощи стандартных методов [23]. Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

Экспериментальные животные

В экспериментах использовали самцов мышей линии C57BL/6 (вес 20–25 г), полученных из питомника “Столбовая” (Московская область) и прошедших семидневный карантин после прибытия. Животных содержали при естественном световом режиме, постоянном доступе к питьевой воде и корму. Изатин (100 мг/кг) и депренил (10 мг/кг) вводили внутривентриально за 24 ч до забоя. Контрольным животным вводили внутривентриально эквивалентный объём физиологического раствора.

Получение лизатов гомогенатов мозга

После декапитации животных под лёгким эфирным наркозом ткань измельчали в гомогенизаторе SilentCrusher S (“Heidolph”, США) при 50000 об/мин в 0,05 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4 (буфер А), для получения 30% гомогената. После добавления тритона X-100 (конечная концентрация 3%), инкубации в течение 60 мин при 4°C и последующего трёхкратного разведения буфером А пробы центрифугировали при 16000 g в течение 30 мин; полученную надосадочную жидкость (лизат) использовали для аффинной хроматографии на 5-аминоизатинсефарозе для последующего масс-спектрометрического анализа.

Аффинная хроматография и подготовка проб для масс-спектрометрического анализа

Лизаты гомогенатов мозга (концентрация белка примерно 10 мг/мл) добавляли к суспензии 5-аминоизатинсефарозы (1:1) и инкубировали 2 ч при 4°C и медленном перемешивании. Аффинный сорбент промывали 100 объёмами буфера А для удаления неспецифически связавшихся белков, после чего остальные белки элюировали с использованием колонки (1×2 см) при комнатной температуре сначала 30 мл 1 мМ изатина в буфере А, потом тем же объёмом 1 М NaCl в буфере А. Элюат (30 мл) концентрировали до 0,25 мл при помощи центрифужного устройства Amicon Ultra (“Millipore”, США). Белки экстрагировали смесью хлороформ-метанол [14], трипсинолиз проводили непосредственно на центрифужных мембранных фильтрах Vivaspin 500 (“Sartorius Stedim Biotech”, Германия) с мембраной на 10000 Да, как описано в [14].

Пробы выпаривали при помощи вакуумного концентратора 5301 (“Eppendorf”, Германия), растворяли в 0,1% муравьиной кислоте и анализировали при помощи LC-MS/MS.

Для определения неспецифически связывающихся с аффинным сорбентом белков использовали контрольную бромциан-активированную сефарозу, которую подвергали тем же процедурам, что и 5-аминоизатинсефарозу, но без добавления аффинного лиганда.

Масс-спектрометрический анализ

Хроматографическое разделение проводили на системе Ultimate 3000 RSLC Nano (“Thermo Scientific”, США) с установленным объёмом петли инжектора 5 мкл и коэффициентом вымывания пробы из петли – 3. Образцы постоянно термостатировали в пределах температуры +8...+10°C. Скорость отбора пробы составляла 12 мкл/мин, скорость инъекции пробы – 15 мкл/мин. Скорость потока аналитического насоса была 0,3 мкл/мин, ограничение по давлению составляло не более 800 бар (номинальное ограничение не более 1000 бар) с динамическим ускорением потока при градиенте 0,996 мкл/мин². Коэффициент вязкости на канале “А” – 101%, на канале “В” – 64,7%. Аналитическое время было 55 мин, время уравнивания – 13 мин, общее время анализа составляло 68 мин. Разделение пептидов проводили в градиенте подвижной фазы “А” (водный раствор 0,01% муравьиной кислоты, 0,03% уксусной кислоты, pH 2,63 при 21,4°C), и подвижной фазы “В” (90% ацетонитрила, 10% метанола, 0,01% муравьиной кислоты, 0,03% уксусной кислоты) на стационарной фазе Acclaim Permapar® (геометрия 75 мкм × 150 мм, 1,8 мкм, 60 Å). Начальные условия градиента элюции: 98% “А”: 2% “В”, скорость потока 0,3 мкл/мин, давление на колонку 310–320 бар, скорость загрузки на обогащающую колонку – 15 мкл/мин. Для увеличения эффективности промывки колонки от связанных гидрофобных компонентов в ходе хроматографического разделения применяли динамическое изменение скорости потока до 0,45 мл/мин при высоком относительном содержании подвижной фазы “В”.

Масс-спектрометрический анализ проводили на гибридном масс-спектрометре высокого разрешения Orbitrap Fusion ("Thermo Scientific") с источником ионизации NSI в режиме положительной электростатической ионизации и динамическим потенциалом на входной S-линзе. Прекурсорные ионы регистрировали с использованием орбитального масс-анализатора с разрешением 60K в диапазоне m/z 425–1250 с максимальной скоростью накопления ионов – 15 мс, или минимальным числом интеграции – 4e5 ионов. Селекция по зарядному состоянию $z = 2+...6+$, активное динамическое исключение после шести сканов ($n=6$) в течение 4 с длительностью 180 с с асимметричной изоляцией $+10/-25$ ppm. Пик-зависимая активация сканирования на уровне 40% высоты хроматографического пика при средней величине FWHM = 24 с и уровнем сигнала к шуму не менее 150. Tandemное сканирование проводилось после изоляции через квадруполь с окном изоляции $\pm 0,75$ Th со сдвигом 0,5 Th. Тип активации – HCD (higher-energy collision dissociation), относительная энергия активации – 27% с переменным смещением $\pm 20\%$. Тип детектора фрагментных ионов – орбитальный с разрешением 15K с максимальным временем накопления 47 мс, или числом интеграции ионов – 5e4.

Анализ данных

Исходные файлы данных поставщиков (raw-формат) были преобразованы в подходящий для поиска mgf-формат с помощью программы MSConvert (ProteomeWizard). Идентификацию проводили против базы данных аминокислотных последовательностей белков (Human, версия Uniprot от июня 2019 года) с включением обращённых последовательностей для верификации полученных идентификаций. Для проведения поиска в качестве гидролизующего фермента был выбран трипсин (специфическое расщепление по остаткам лизина и аргинина, если в положении P1 не стоит пролин) с максимальным допустимым

числом пропущенных внутренних участков расщепления не более двух. Разрешённые зарядные состояния были от $z=2+$ до $z=6+$ с допустимой точностью измерения прекурсорного иона ± 5 ppm и допустимой точностью измерения фрагментного иона $\pm 0,01$ Да. Переменной модификацией, используемой для поиска и обнаружения, были дезамидирование Q/E, однократное окисление метионина и 4-гидроксипролин. Фиксированной модификацией было пиридилэтилирование 4-винилпиридином. Результаты верифицировали по уровню отсечения FDR=1% (false discovery rate) на основе суммарной частоты ложных положительных результатов для PSM (peptide-spectra match). Анализ распределения белковых идентификаций и кластеризацию по биологическим процессам, молекулярным функциям и внутриклеточной локализации осуществляли с использованием открытого ресурса DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; версия 6.8) с уровнем $p < 0,01$ по точному тесту Фишера и с использованием статистической поправки Бонферрони [24, 25].

В каждом протеомном эксперименте использовали суммарные препараты, полученные в ходе аффинного обогащения лизатов гомогенатов мозга не менее двух мышей. Каждый из представленных в таблицах белков был идентифицирован, по меньшей мере, в трёх независимых экспериментах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе протеомного профилирования изатин-связывающих белков печени контрольных мышей с использованием в качестве аффинного лиганда 5-аминоизатина было идентифицировано 350 белков (см. приложение), представляющих следующие функциональные группы (табл. 1): (I) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (II) ферменты липидного обмена; (III) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот

Таблица 1. Влияние однократного введения изатина (100 мг/кг, в/бр) или депренила (10 мкг/кг, в/бр) на число идентифицированных изатин-связывающих белков мозга мышей и их распределение по функциональным группам*

Группа**	Контроль	Изатин	Депренил
I	24	27↑	17↓
II	11	6↓	6↓
III	21	25↑	18↓
IV	100	74↓	71↓
V	85	26↓	19↓
VI	40	19↓	21↓
VII	69	40↓	38↓
Всего	350	217↓	190↓

Примечание. * – Списки идентифицированных изатин-связывающих белков приведены в Приложении в виде дополнительных материалов, доступных на сайте журнала: pbmc.ibmc.msk.ru. ** – Функциональные группы изатин-связывающих белков: (I) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена; (II) ферменты липидного обмена; (III) ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений; (IV) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (V) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (VI) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (VII) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов. Стрелки показывают снижение (↓) или увеличение (↑) числа идентифицированных изатин-связывающих белков в печени мышей, получавших инъекции изатина или депренила по сравнению с контролем.

и других азотистых соединений; (IV) белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе; (V) белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки; (VI) антиоксидантные и защитные белки/ферменты; (VII) белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов.

Введение нейропротекторной дозы изатина (100 мг/кг) или депренила (10 мг/кг) приводило к существенному (на 38% и 46% соответственно) снижению общего числа белков, связывавшихся с иммобилизованным в качестве аффинного сорбента 5-аминоизатином (табл. 1). Наиболее выраженное снижение было характерно для белков IV-VII функциональных групп. Полученные результаты согласуются с данными нашего предыдущего профилирования изатин-связывающих белков, выполненного на печени мышей после курсового введения изатина и депренила [22]. Значительно большее число идентифицированных белков, очевидно, связано не только с тканевыми особенностями (печень и мозг), но и с использованием в данной работе другого аналога – 5-аминоизатина (а не 5-аминокапролизатина, как при профилировании изатин-связывающих белков печени).

Сравнение профилей изатин-связывающих белков мозга интактных мышей и мышей, получивших инъекцию изатина и депренила, позволило выявить более 200 специфических изатин-связывающих белков контроля, которые не связывались с аффинным сорбентом после введения этих веществ животным (табл. 2, 3). Это согласуется с ранее высказанным предположением, что изменение профиля изатин-связывающих белков обусловлено именно связыванием изатина и депренила, которое препятствует последующему взаимодействию этих белков с аффинным сорбентом – аналогом изатина [22]. В пользу этого свидетельствуют и данные о существующей конкуренции между изатином и депренилом за связывание с модельными белками-мишенями [17, 21].

По субклеточной локализации специфичные для интактного мозга изатин-связывающие белки были отнесены к основным компартментам клетки (рисунок); небольшой процент белков фигурирует, по данным DAVID, в экзосомах, внеклеточном матриксе и в области межклеточных адгезионных контактов. Последнее особенно интересно в связи с имеющимися в литературе данными о действии депренила именно на процессы межклеточной адгезии нейрональных и других типов клеток [26], а также адгезию, хемотаксис и пролиферацию моноцитов человека [27].

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно имеющимся в литературе данным, однократное введение нейропротекторной дозы изатина в дозе 50-100 мг/кг может приводить к увеличению его концентрации в мозге до 70 мкМ и даже выше (особенно при условии неравномерного распределения в структурах мозга) [1]. В связи

с этим взаимодействие введенного изатина со своими молекулярными мишенями не может не оказывать влияния на результаты протеомного профилирования белков мозга с использованием иммобилизованного аналога изатина в качестве аффинного лиганда. Действительно, предварительное введение животным изатина или депренила оказывало существенное влияние на связывание белков мозга с иммобилизованным 5-аминоизатином. Выявленные при сравнительном анализе протеомных профилей изатин-связывающие белки, специфичные для интактных животных, могут рассматриваться в качестве прямых мишеней для изатина, и, по-видимому, для депренила. К их числу относятся, например, такие полифункциональные белки (так называемые moonlighting proteins [33]), как ГАФД, енолаза, 1,6-фруктозо-бисфосфатацальдолаза (табл. 2, группа I). Ранее они уже были обнаружены среди изатин-связывающих белков интактного мозга животных, связывающихся с иммобилизованным 5-аминоизатином [12]. Для ГАФД взаимодействие с изатином было подтверждено с использованием нескольких независимых методов (биосенсорный анализ с иммобилизованным 5-аминоизатином или 5-аминокапролизатином, а также связывание с [³H]-изатином) [10, 17].

В последнее время накапливается всё больше данных о том, что нейропротекторное действие депренила (селегилина) и его аналогов (например, розагилина и др.) осуществляется независимо от (необратимого) торможения МАО Б [15, 26-31]. Например, получен ряд данных, свидетельствующих в пользу того, что индукция депренилом ряда белков окислительного стресса может быть опосредована фосфорилированием рецепторной тирозинкиназы (Trk receptor), последующей активацией PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназа), которая индуцирует транслокацию в ядро транскрипционного фактора Nrf2 [29]. Последний играет важную роль в нейропротекции при экспериментальном МФТП-индуцированном паркинсонизме [32]. Эти, а также рассмотренные выше данные (см., например, [26, 27]), свидетельствуют о том, что фармакологические эффекты депренила могут быть опосредованы различными внутриклеточными белками. По-видимому, к их числу может быть отнесён и ряд изатин-связывающих белков, фигурирующих в таблицах 2 и 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеомный анализ изатин-связывающих белков мозга мышей, которым однократно ввели нейропротекторную дозу изатина (100 мг/кг) или депренила (10 мг/кг), позволил выявить репрезентативную группу белков (n=200), чувствительных к введению этих веществ. Изменение профиля изатин-связывающих белков, по-видимому, обусловлено накоплением изатина и депренила и их взаимодействием с белками-мишенями, препятствующим связыванию последних с аффинным сорбентом. В таком контексте идентифицированные изатин-связывающие белки мозга контрольных

Таблица 2. Изатин-связывающие белки мозга функциональных групп I-III, специфичные для контрольных животных*

Идентификатор белка	Название белка	Субклеточная локализация
I белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и углеводного обмена (n=14)		
P17182	Enolase	C, N, PM
P21550	Beta-enolase	C, Ex
Q64467	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C, N
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	C, Mch, M
P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	C, Ex, Mch
Q03265	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	Ex, M, E, Mch
Q9D2G2-2	Isoform 2 of Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	Mch, Ex, N
Q8BMF4	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial	Mch
P41317	Electron transfer flavoprotein subunit beta	Mch
P08249	Malate dehydrogenase, mitochondrial	Mch, Ex, N, M
P47857	6-phosphofructokinase, muscle type	C, Ex
P62814	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	Mch, M
Q9CWG8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] complex I, assembly factor 7	Mch
P70699	Lysosomal alpha-glucosidase	L, Ex, M
II ферменты липидного обмена (n=7)		
O35083	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase alpha	C, M
Q80XL6	Acyl-CoA dehydrogenase family member 11	Mch, P, N
Q99JV5	StAR-related lipid transfer protein 4	N, C
Q80TF6	StAR-related lipid transfer protein 9	N, C
Q9R1S3-2	Isoform 2 of GPI ethanolamine phosphate transferase 1	ER
Q9JI60	Lecithin retinol acyltransferase	C, M
Q91V12	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	C, Ex
III белки/ферменты, участвующие в метаболизме белков, аминокислот и других азотистых соединений (n=19)		
Q9D9G7	Protein 1700074P13Rik	G
Q6P1B1	Xaa-Pro aminopeptidase 1	C, Ex
Q91WT9	Cystathionine beta-synthase	N, C
Q9JLJ2	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	C, Ex, Mch
Q9D8C9	Purine nucleoside phosphorylase	C, N, Ex
O35098-2	Isoform 2 of Dihydropyrimidinase-related protein 4	C
O08759	Ubiquitin-protein ligase E3A	C, N
Q925F3	Probable E3 ubiquitin-protein ligase RNF144A	C, M
E9Q7F2	E3 ubiquitin-protein ligase RNF169	N
Q62191	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM21	C, N
Q64514	Tripeptidyl-peptidase 2	C, N
Q3URQ7	Methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing protein	C
Q60823	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	C, N, M
Q8BGQ7	Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic	C, Ex, M
Q09199	Beta-1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase 2	M
Q9WUV2	Alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3	M
Q5U467	F-box and WD-40 domain protein 12	C
P49722	Proteasome subunit alpha type-2	C, Ex
F8VPU6	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	C

Примечание. * – В этой и других таблицах (включая Приложение) названия идентифицированных белков и их молекулярные характеристики приведены в том виде, в котором они фигурируют в базе данных Uniprot (использованной для идентификации изатин-связывающих белков). Обозначения клеточных компартментов: C – цитозоль; E – внеклеточное пространство (экспортируемый белок); ER – эндоплазматический ретикулум; Ex – экзосомы; G – комплекс Гольджи; L – лизосомы; M – мембраны; Mch – митохондрии; N – ядро; P – пероксисомы; PM – плазматическая мембрана.

ПРОФИЛЬ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА ПРИ ВВЕДЕНИИ ИЗАТИНА

Таблица 3. Изатин-связывающие белки мозга функциональных групп IV-VII, специфичные для контрольных животных

Идентификатор белка	Название белка	Субклеточная локализация
IV белки, участвующие в образовании цитоскелета и экзоцитозе (n=53)		
A6BLY7	Keratin, type I cytoskeletal 28	C, Ex
O08599	Syntaxin-binding protein 1	C, M, Mch
Q02248	Catenin beta-1	C, Ex, Cy
P58771	Tropomyosin 1, alpha, isoform CRA_i	C, M, Cy
P21107	Tropomyosin alpha-1 chain	C, Cy
Q8VDD5	Tpm1 protein	C, Ex, Cy, N
P68368	Tropomyosin alpha-3 chain	C
Q9JJZ2	Myosin-9	C
P68372	Tubulin alpha-4A chain	C
P99024	Tubulin alpha-8 chain	C
Q9D6F9	Tubulin beta-4B chain	C
A2AQ07	Tubulin beta-5 chain	C
Q0VBK2	Tubulin beta-4A chain	C
P62627	Tubulin beta-1 chain	C
Q9JKK7	Keratin, type II cytoskeletal 80	C, Cy
Q9QYR6	Dynein light chain roadblock-type 1	C, Cy
P47754	Isoform 3 of Tropomodulin-2	C, M, Ex
P39053-2	Microtubule-associated protein 1A	C
Q8R0W0	F-actin-capping protein subunit alpha-2	C, Cy
Q64291	Isoform 2 of Dynamin-1	C
Q6IRU2	Epiplakin	C, M, Ex, Cy
Q32ME9	Keratin, type I cytoskeletal 12	C
Q7M6Z4	Tropomyosin alpha-4 chain	C
Q9D4B2	Desmocollin 1	C
Q9D3R6	Kinesin-like protein KIF27	C, Cy, N
A1A5B6	Tetratricopeptide repeat protein 25	C
Q9JHJ0	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2	C, Cy
E9QN87	TBC1 domain family member 25	C, Ex, Cy
Q8C079	Tropomodulin-3	C, Ex, N
Q9D1D4	Plectin	M, Ex
E9PY46	Striatin-interacting protein 1	C
Q3TRJ4	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10	PM, G, Ex
P56716	Protein Ift140	C
Q8CJ40	Keratin, type I cytoskeletal 26	C, Cyt, Ex
Q6IRU5-2	Oxygen-regulated protein 1	C
Q6P3A1	Rootletin	N
Q8C5W3	Isoform 2 of Clathrin light chain B	PM, Cyt, C
Q80VM7	Stathmin domain-containing protein 1	C
Q9QYY8	Tubulin-specific chaperone cofactor E-like protein	C, Ex, Cyt, N
D3YXG9	Ankyrin repeat domain-containing protein 24	C
A2AQB2	Spastin	C, Ex
Q8VEJ9	Lebercilin-like protein	C, M
P0C0A3	Protein Neb	C, Ex, M
Q9ERG0	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	ER, C, Cyt
P59999	Charged multivesicular body protein 6	ER, C, Cyt, Ex
Q3U2I3	LIM domain and actin-binding protein 1	C
Q3UW98	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4	C
Q8BLN6	FTS and Hook-interacting protein	E, L, M
Q9DC07	Chloride channel calcium activated 7	PM, C
Q9D8F3	Protein unc-80 homolog	PM, M
A6BLY7	Nebulette	C, Ex
O08599	Solute carrier family 52, riboflavin transporter, member 2	PM
P41317	Mannose-binding protein C	PM, E
V белки-регуляторы экспрессии генов, клеточного деления и дифференцировки (n=67)		
O88569	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	N, Ex, M
Q8BG05	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	N, C
O88569	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	N, M
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	C, N
Q7TMK9	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	N, M, C
Q8VHM5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	N
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	N
Q9WV02	RNA binding motif protein, X chromosome, isoform CRA_b	N, Ex, M
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	N, C, Ex

Таблица 3. Изатин-связывающие белки мозга функциональных групп IV-VII, специфичные для контрольных животных (продолжение)

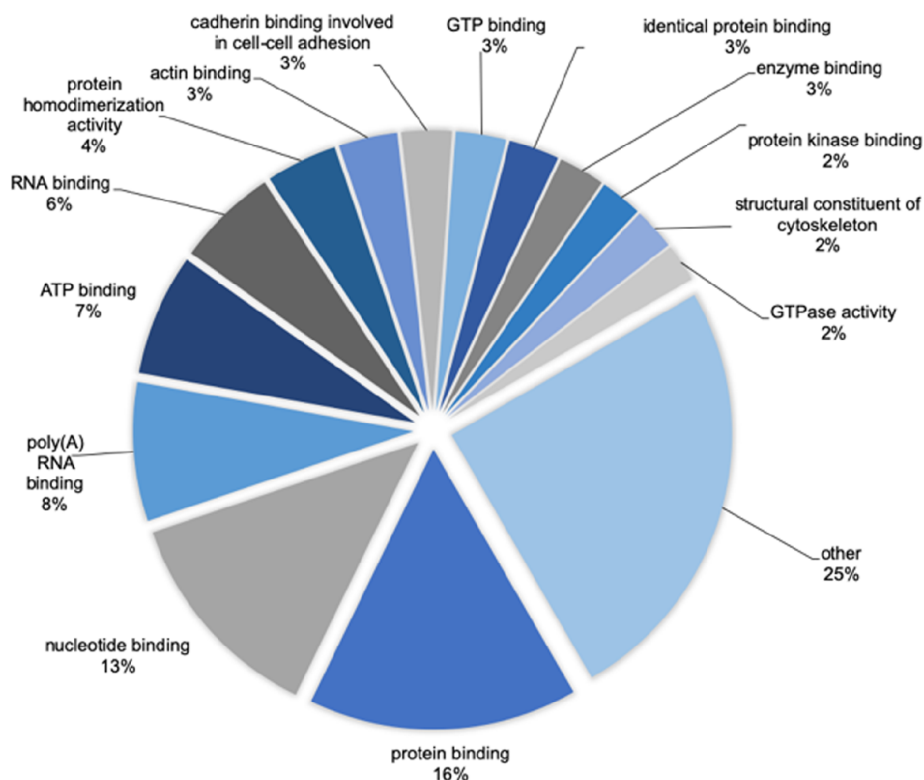
Идентификатор белка	Название белка	Субклеточная локализация
G3X9D5	Histone H2B type 2-B	N
A2BDX3	Adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3	C
Q91XV3	Brain acid soluble protein 1	PM, N, M, C, Ex
Q60668	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	N
Q01768	Nucleoside diphosphate kinase B	C, Mch, M
P15532	Nucleoside diphosphate kinase A	C, Mch, M
G3X9C2	F-box only protein 50	C, Ex
P99027	60S acidic ribosomal protein P2	C, M, Ex
Q8CCS6	Polyadenylate-binding protein 2	C
P70372	ELAV-like protein 1	N, C, M
Q8R1M2	Histone H2A.J	N, Ex
P58252	Elongation factor 2	N, M, C, E
P62320	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	N, C, Ex
Q9Z130	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	N, C, Ex
Q6P1H6	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2	ER
P62309	Small nuclear ribonucleoprotein G	N, C
Q8VIJ6	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	N, M, Ex
Q8R081	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	N, M, C, Ex
Q8BQ33	Treslin	N
Q6A078	Centrosomal protein of 290 kDa	N, C, Cyt, M
P56959	Isoform 2 of Centrosomal protein of 290 kDa	N
Q78ZA7	RNA-binding protein FUS	N
Q925Q8	Nucleosome assembly protein 1-like 4	N
P67984	Dachshund homolog 2	C, N, Ex, E
P35583	60S ribosomal protein L22	C
Q6ZWV7	Hepatocyte nuclear factor 3-beta	M, C
Q99020	60S ribosomal protein L35	C
A2ANY6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	N, M, C
Q5PR68	Midasin	N, C, Cy
Q62187	Centrosomal protein of 112 kDa	N
Q7TNB8	Transcription termination factor 1	N
Q3U8K7	Protein strawberry notch homolog 2	N
Q8BNA6	Histone-lysine N-methyltransferase SUV420H1	M
Q63739	Protocadherin Fat 3	C, Cyt, Ex, N, M
Q8BVK9	Protein tyrosine phosphatase type IVA 1	C
P30681	Sp110 nuclear body protein	N, C
Q6ZWX6	High mobility group protein B2	N, M, C, Ex
Q7TSG3	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	C, N, Cyt
Q8BMD7	F-box only protein 5	N
Q9D658	MORC family CW-type zinc finger protein 4	N, M, C
Q3UKU1	Protein tyrosine phosphatase type IVA 3	E, PM
O70133	RNA polymerase II elongation factor ELL2	N, C, M
D3YXT2	ATP-dependent RNA helicase A	N
O55135	Ribosomal protein	C, N, Ex
O08811	Eukaryotic translation initiation factor 6	C, Cyt, N
Q8CE96	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit	N
Q6RT24	tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6	C, M, Cyt, N
Q8CFL8	Centromere-associated protein E	N
Q9CVD2	Zinc finger SWIM domain-containing protein 3	C, N, Mch
Q8VDL9	Ataxin-3	C, N
Q99KX1	Zinc finger protein GLIS2	N
B2KF05	Myeloid leukemia factor 2	N
Q8VCY6	Bromodomain and PHD finger containing, 3	N
Q6P4S8	U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	N, M
E9Q9Q2	Integrator complex subunit 1	N
A2AM05	Protein R3hdm1	C, Ex, Cyt
Q64707	Centlein	N
O88569	U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 1	M, C, Ex
VI антиоксидантные и защитные белки/ферменты (n=22)		
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	N, C
O08807	Peroxiredoxin-4 (Fragment)	C, Mch, N, Ex
Q99LX0	Protein DJ-1	Mch, C, N, Ex
Q9EST1	Gasdermin-A	C, M
Q32M21	Gasdermin-A2	PM, M

ПРОФИЛЬ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ МОЗГА ПРИ ВВЕДЕНИИ ИЗАТИНА

Таблица 3. Изатин-связывающие белки мозга функциональных групп IV-VII, специфичные для контрольных животных (продолжение)

Идентификатор белка	Название белка	Субклеточная локализация
P24270	Catalase	C, Ex, M, Mch
F8VPN3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	C, N, ER, Mch
Q8BU51	BPI fold-containing family B member 6	E
P08228	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	C, E, N, Mch
P09528	Ferritin heavy chain	Ex, N, Mch
P18527	Ig heavy chain V region 914	C
Q9R002	Interferon-activable protein 202	C, N
P08414	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	C, N, Ex
Q70FJ1	A-kinase anchor protein 9	C, G
P12388	Plasminogen activator inhibitor 2, macrophage	C
Q9JJG9	Nitric oxide-associated protein 1	M, Mch
Q9JKY7	Cytochrome P450 CYP2D22	ER, C
G5E8G2	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	ER, N
Q80TQ2-3	Isoform 3 of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD	ER, N, C
Q52KR2	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 2	C, M
A2A9Q9	Protein Gm14781	C
D3Z0M4	Peroxisomal membrane protein 11B	P
VII белки, участвующие в передаче сигналов и регуляции активности ферментов (n=45)		
Q7SIG6	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2	C, M
Q9ERK4	Exportin-2	N, C, Ex, M
P10107	Annexin A1	PM, Ex, N, M
Q2VIS4	Filaggrin-2	C
Q99MK8	Beta-adrenergic receptor kinase 1	PM
P30275	Creatine kinase U-type, mitochondrial	Mch, M, Ex
P50516	V-type proton ATPase catalytic subunit A	PM, C, Ex, Mch
Q7TN08	Dapper homolog 2	Mch
Q3UR32	P2X purinoceptor	PM, M
E9Q8I9	Protein furry homolog	C, Cyt
P34968	5-hydroxytryptamine receptor 2C	M
Q504M8	Ras-related protein Rab-26	M
Q9D2Q8	Protein S100-A14	C, Ex
Q9CPT0	Apoptosis facilitator Bcl-2-like protein 14	C
Q8C0T9	Adenylate cyclase type 10	PM, M, N, Mch
P28660	Nck-associated protein 1	M, C, Ex
P27038	Activin receptor type-2A	PM, C
Q3UG50	Mas-related G-protein coupled receptor member X2	PM
P70194	C-type lectin domain family 4 member F	M
Q04899	Cyclin-dependent kinase 18	C
Q8BSH2	Olfactomedin-like 1	E
Q8BZN2	Potassium voltage-gated channel subfamily V member 1	PM
Q80U19	Disheveled-associated activator of morphogenesis 2	Ex
P70227	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	ER, M, N, C
Q61739	Isoform Alpha-6X1A of Integrin alpha-6	PM
Q8CDM4	Coiled-coil domain-containing protein 73	C
P32082	Growth hormone-releasing hormone receptor	PM, C
Q60855	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1	PM, M, Mch, C
O35627	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 3	N, C
Q8JZZ7	Latrophilin-2	M
G5E8K3	Ankyrin 3, epithelial, isoform CRA_b	L, C, Cyt
Q7TQG1	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6	C
P21275	Bone morphogenetic protein 4	E, C
Q80T11	Usher syndrome type-1G protein homolog	PM, C, Cyt
Q3UMG5	Leucine-rich repeat and calponin homology domain-containing protein 2	C
Q6R5N8	Toll-like receptor 13	M
Q8VIM9	Immunity-related GTPase family Q protein	C
Q9QUG9	RAS guanyl-releasing protein 2	C, PM
O70293	G protein-coupled receptor kinase 6	PM, M, C
Q64487	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase delta	PM, Ex, M
Q01063	cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D	C, Cyt, M
Q99M51	Cytoplasmic protein NCK1	C, N
B0V2N1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S	PM, Ex
Q9Z0U9	Sphingosine 1-phosphate receptor 3	PM
O35309	N-myc-interactor	C, N

А



Б

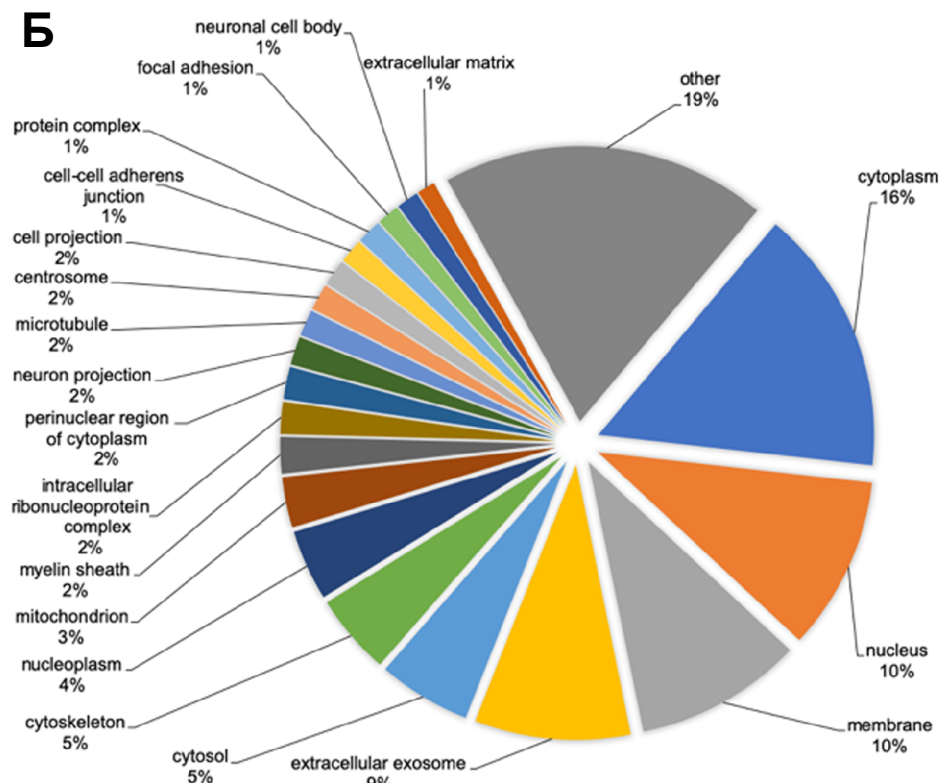


Рисунок. Распределение изатин-связывающих белков мозга, специфичных для контрольных мышей, по молекулярным функциям (А) и внутриклеточной локализации (Б) в соответствии с аннотированными терминами и определениями Gene Ontology. Анализ распределения белков проведён с использованием ресурса открытого доступа DAVID (версия 6.8). Для каждого выделенного класса определено значение критерия точного теста Фишера при заданном уровне значимости $p < 0,01$ для тестовой выборки белков определённого класса против полногеномной выборки белков тестируемого класса (обогащение) с последующей коррекцией достоверности поправкой Бонферрони. Идентификаторы классов молекулярных функций и внутриклеточных локализаций, а также численные уровни значимости (p-value) приведены в Приложении. Категория “Other” на диаграмме включает несколько минорных классов молекулярных функций и внутриклеточных локализаций, детали которых в полном объёме приведены в Приложении.

животных, которые при введении изатина или депренила перестают связываться с аффинным сорбентом (иммобилизованным аналогом изатина), очевидно, являются специфическими мишенями, непосредственно взаимодействующими с изатином (а также с депренилом) *in vivo*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрический анализ белков выполнен в ЦКП “Протеом человека” при НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (в части масс-спектрометрического анализа) и поддержана грантом РФФИ 18-015-00042 (исследование эффекта изатина и депренила на животных и подготовка проб для масс-спектрометрического анализа).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты выполнены с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

- Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A. (2018) *Biofactors*, **44**(2), 95-108.
- Phogat P., Singh P. (2015) *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **15**(1), 28-31.
- Medvedev A., Buneeva O., Glover V. (2007) *Biologics*, **1**(2), 151-162.
- Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. (2005) *Stress*, **8**(3), 175-183.
- Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391.
- Cover Picture (2010) *Proteomics*, **10**(1), DOI: 10.1002/pmic.200990102
- Guo H. (2019) *Eur. J. Med. Chem.*, **164**, 678-688.
- De Moraes Gomes P.A.T., Pena L.J., Leite A.C.L. (2019) *Mini Rev. Med. Chem.*, **19**(1), 56-62.
- Vine K.L., Matesic L., Locke J.M., Ranson M., Skropeta D. (2009) *Anticancer Agents Med. Chem.*, **9**(4), 397-414.
- Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M.-C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A. (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2763-2772.
- Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. (2010) *Proteomics*, **10**, 23-37.
- Buneeva O.A., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И. (2012) *Биохимия*, **77**, 1584-1599. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Zgoda V.G., Medvedev A.E., Archakov A.I. (2012) *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1584-1599.]
- Medvedev A.E., Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Медведева М.В., Неробкова Л.Н., Каница И.Г., Згода В.Г. (2017) *Биохимия*, **82**, 470-480. [Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Medvedeva M.V., Nerobkova L.N., Kapitsa I.G., Zgoda V.G. (2017) *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 470-480.]
- Buneeva O., Kopylov A., Kapitsa I., Ivanova E., Zgoda V., Medvedev A. (2018) *Cells*, **7**, 91, DOI: 10.3390/cells7080091
- Szoko E., Tabi T., Riederer P., Vecsei L., Magyar K. (2018) *J. Neural Transm. (Vienna)*, **125**(11), 1735-1749.
- Youdim M., Edmondson D., Tipton K. (2006) *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 295-308.
- Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Fedchenko V., Medvedeva M., Ivanov Y., Glover V., Sandler M. (2006) *J. Neural Transm.*, **Suppl. 71**, 97-103.
- Ou X.M., Stockmeier C.A., Meltzer H.Y., Overholser J.C., Jurjus G.J., Dieter L., Chen K., Lu D., Johnson C., Youdim M.B., Austin M.C., Luo J., Sawa A., May W., Shih J.C. (2010) *Biol. Psychiatry*, **67**(9), 855-863.
- Hara M.R., Thomas B., Cascio M.B., Bae B.I., Hester L.D., Dawson V.L., Dawson T.M., Sawa A., Snyder S.H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**(10), 3887-3889.
- Tatton W., Chalmers-Redman R., Tatton N. (2003) *J. Neural Transm. (Vienna)*, **110**, 509-515.
- Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Медведева М.В., Иванов Ю.Д., Гловер В., Медведев А.Е. (2006) *Биомед. химия*, **52**, 413-418. [Buneeva O.A., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Ivanov Yu.D., Glover V., Medvedev A.E. (2006) *Biomed. khimiya*, **52**, 413-418.]
- Бунеева О.А., Копылов А.Т., Згода В.Г., Медведев А.Е. (2018) *Биомед. химия*, **64**(4), 354-359. [Buneeva O.A., Kopylov A.T., Zgoda V.G., Medvedev A.E. (2018) *Biomed. khimiya*, **64** (4), 354-359.]
- Medvedev A.E., Goodwin B.L., Sandler M., Glover V. (1999) *Biochem. Pharmacol.*, **57**(8), 913-915.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. (2009) *Nature Protoc.* **4**(1), 44-57.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**(1), 1-13.
- Jenei V., Zor K., Magyar K., Jakus J. (2005) *J. Neural Transm. (Vienna)*, **112**(11), 1433-1445.
- Lajkó E., Polgár L., Láng O., Lengyel J., Kohidai L., Magyar K. (2012) *J. Neural Transm. (Vienna)*, **119**(5), 545-556.
- Tatton W.G., Chalmers-Redman R.M.E. (1996) *Neurology*, **47**(Suppl. 3), S171-S183.
- Nakaso K., Nakamura C., Sato H., Imamura K., Takeshima T., Nakashima K. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**, 915-922.
- Turchan-Cholewo J., Liu Y., Gartner S., Reid R., Jie C., Peng X., Chen K.-C., Chauhan A., Haughey N., Cutler R., Mattson M.P., Pardo C., Conant K., Sacktor N., McArthur J.C., Hauser K.F., Gairola C., Nath A. (2006) *Neurobiology of Disease*, **23**, 109-119.
- Sanz E., Quintana A., Hidalgo J., Marco J.L., Unzeta M. (2009) *Mol. Cell. Neurosci.*, **41**, 19-31.
- Chen P.-C., Vargas M.R., Pani A.K., Smeyne R.J., Johnson D.A., Kan Y.W., Johnson J.A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(8), 2933-2938.
- Jeffery C.J. (2017) *Phil. Trans. R. Soc. B*, **373**, 20160523. DOI: 10.1098/rstb.2016.0523

Поступила в редакцию: 11. 07. 2019.
После доработки: 22. 08. 2019.
Принята к печати: 24. 08. 2019.

THE EFFECT OF A NEUROPROTECTIVE DOSE OF ISATIN OR DEPRENYL TO MICE ON THE PROFILE OF BRAIN ISATIN-BINDING PROTEINS

O.A. Buneeva¹, I.G. Kapitsa², E.A. Ivanova², A.T. Kopylov¹, V.G. Zgoda¹, A.E. Medvedev^{1}*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: professor57@yandex.ru
²Zakusov Institute of Pharmacology, 8 Baltiskaya str., Moscow, 124315 Russia

Isatin (indol-2,3-dione), an endogenous biofactor found in the brain, peripheral tissues and biological body fluids of humans and animals, exhibits a wide range of biological and pharmacological activities. They are realized via interaction with numerous isatin-binding proteins. Some of these proteins identified during proteomic profiling of the brain are involved in the development of neurodegenerative pathology. In the context of the neuroprotective effect, the effect of isatin is comparable to the effects of deprenyl (selegiline), a pharmacological agent used for treatment of Parkinson's disease. In this study, we have investigated the effect of a single dose administration of isatin (100 mg/kg) and deprenyl (10 mg/kg) to mice on the profile of the brain isatin-binding proteins. Comparative proteomic analysis of brain isatin-binding proteins of mice treated with isatin or deprenyl resulted in identification of a representative group of proteins (n=200) sensitive to the administration of these substances. The change in the profile of isatin-binding proteins may be obviously attributed to accumulation of isatin and deprenyl in the brain and their interaction with target proteins; this prevents protein binding to the affinity sorbent. Thus identified brain isatin-binding proteins of the control animals obviously represent specific targets that interact directly with isatin (and also with deprenyl) *in vivo*. Isatin or deprenyl administered to animals interact with these proteins and thus inhibit their binding to the affinity sorbent (immobilized isatin analogue).

Key words: isatin; deprenyl; isatin-binding proteins; mouse liver; proteomic profiling

Funding. This work was supported by the Fundamental Scientific Research Program for 2013-2020 of the State Academies of Sciences for 2013-2020 (mass spectrometry analysis) and by a grant from the Russian Foundation for Basic Research, 18-015-00042 (the study of the effect of isatin and deprenyl on animals and sample preparation for mass spectrometric analysis).

Received: 11.07.2019, revised: 22.08.2019, accepted: 24.08.2019.