

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОНПЕРОКСИДАЗЫ В ТКАНЯХ СЕРДЦА КРЫС ПРИ МЕХАНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ГЕМАТООФТАЛЬМИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

¹Гуленко О.Н., ²Девяткин А.А., ³Борискин П.В., ¹Павлова О.Н.,
³Леонов В.В., ⁴Каримова Р.Г.

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный университет путей сообщения», Самара

²ООО «ТестГен», Ульяновск

³Частное учреждение образовательная организация высшего образования
«Медицинский университет «Реавиз», Самара

⁴ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины
имени Н.Э. Баумана», Казань

Резюме. В результате механической травмы глаза и повреждения гематоофтальмического барьера возникает воспалительный процесс и, как следствие, оксидативный стресс, который провоцируют ишемию миокарда, так как потребность сердца в кислороде превышает его поступление. Стремительное падение концентрации кислорода в ишемических тканях провоцирует переход окислительного метаболизма в анаэробный. И в этот момент дефицит энергии становится пусковым моментом в цепочке физиологических процессов. Раскрытие молекулярных механизмов проявления оксидативного стресса в тканях сердца позволит разработать эффективные терапевтические подходы к купированию этого состояния. Цель исследования: анализ динамики активности глутатионпероксидазы (ГП) в тканях сердца крыс на фоне оксидативного стресса, вызванного механической травмой глаза. Материалы и методы: эксперимент проводили на клинически здоровых беспородных белых половозрелых крысах мужского пола восьмимесячного возраста, массой 190–210 г в количестве 150 штук, которые содержались в стандартных условиях в виварии. Активность фермента в тканях сердца исследовали до начала опыта, а также на 1, 3, 5, 7 и 14 сутки эксперимента. Полученные результаты опыта подвергали статистической обработке методами непараметрического статистического анализа. Вывод: активность глутатионпероксидазы в тканях сердца крыс при оксидативном стрессе, вызванном механической травмой глаза, наиболее эффективно стабилизируется при стандартной терапии механической травмы глаза с добавлением кверцетина в виде инъекций.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Ключевые слова оксидативный стресс, ткани сердца, гематоофтальмический барьер, крысы, механическая травма глаза, глутатионпероксидаза.

Для цитирования: Гуленко О.Н., Девяткин А.А., Борискин П.В., Павлова О.Н., Леонов В.В., Каримова Р.Г. Исследование изменения активности глутатионпероксидазы в тканях сердца крыс при механическом воздействии на гематоофтальмический барьер // Вестник медицинского института «Реавиз». – 2020. – № 5. – С. 36–44. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2020.5.3>



CHANGES IN GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN CARDIAC TISSUES OF RATS IN RESPONSE TO MECHANICAL INJURY OF THE BLOOD-OCULAR BARRIER

¹Gulenko O.N., ²Devyatkin A.A., ³Boriskin P.V., ¹Pavlova O.N.,
³Leonov V.V., ⁴Karimova R.G.

¹Federal State Budgetary Institution of Higher Education 'Samara State University of Railway Transport,'

²TestGene' LLC, Ulyanovsk

³Private Institution of Higher Education 'Medical University 'Reaviz,' Samara

⁴Federal State Budgetary Institution of Higher Education 'N.E. Bauman Kazan State Academy
of Veterinary Medicine,' Kazan

Abstract. Mechanical eye injury and damage to the blood-ocular barrier cause inflammation resulting in oxidative stress, which, in turn, triggers myocardial ischemia, since the heart's need for oxygen exceeds its supply. A rapid decrease in the oxygen concentration in ischemic tissues causes a switch from oxidative to anaerobic metabolism, when energy deficit initiates a chain of physiological processes. The discovery of the molecular mechanisms underlying the manifestation of oxidative stress in the cardiac tissues will enable the development of effective therapeutic approaches to such condition. *Objective:* to analyze the dynamics of glutathione peroxidase (GP) activity in cardiac tissues of rats in response to oxidative stress caused by mechanical eye injury. *Materials and methods.* In our experiment, we used 150 healthy white mature (8-month old) male rats weighing 190–210 g and kept under standard conditions in a vivarium. GP activity was evaluated before the experiment and then on days 1, 3, 5, 7, and 14. Nonparametric statistical analysis was used in this study. *Conclusion.* GP activity in cardiac tissues of rats during oxidative stress caused by mechanical eye injury was most effectively stabilized by standard treatment for mechanical eye injury plus injections of quercetin.

Competing interests. The authors declare no competing interests.

Funding. This research received no external funding.

Key words: oxidative stress, heart tissues, blood-ocular barrier, rats, mechanical eye injury, glutathione peroxidase.

Cite as: Gulenko O.N., Devyatkin A.A., Boriski P.V., Pavlova O.N., Leonov V.V., Karimova R.G. Changes in glutathione peroxidase activity in cardiac tissues of rats in response to mechanical injury of the blood-ocular barrier // Bulletin of Medical University Reaviz. – 2020. – № 5. – P. 36–44. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2020.5.3>

Введение

В результате механической травмы глаза и повреждения гематоофтальмического барьера возникает воспалительный процесс и, как следствие, оксидативный стресс, который провоцирует ишемию миокарда, так как потребность сердца в кислороде превышает его поступление. В частности, по мнению многих авторов, повреждение клеток миокарда, индуцированное циклами ишемии и реперфузии может быть связано с образованием токсичных АФК [1].

Стремительное падение концентрации кислорода в ишемических тканях провоцирует переход окислительного метаболизма

в анаэробный. И в этот момент дефицит энергии становится пусковым моментом в цепочке физиологических процессов. Из-за увеличения концентрации лактата и ионов водорода изменяются кислотно-щелочное равновесие и энергетически связанные процессы, такие как мембранные ионные градиенты, селективные и неселективные ионные каналы, и ионное равновесие. Вследствие «анаэробной деполяризации» клетки теряют ионы K^+ и приобретают ионы Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} , что создает условия для развития цитотоксического отека. Избыточное содержание ионов Ca^{2+} провоцирует интенсификацию образования АФК, активирует протеазы, которые в свою оче-

редь способствуют трансформации ксантин дегидрогеназы, использующую в виде акцептора электронов кислород и образующую супероксид-анион, перекись водорода, лежащие в основе производства гидроксильных радикалов, повреждающих ткани организма при ишемии и реперфузии [2, 3, 4].

С пониженной антиоксидантной активностью тканей миокарда связано увеличение концентрации АФК после гипоксии и реоксигенации, при этом в миоцитах, эндотелиальных клетках наблюдается чрезвычайно низкое содержание антиоксидантных ферментов [5, 6]. Раскрытие молекулярных механизмов проявления оксидативного стресса в тканях сердца позволит разработать эффективные терапевтические подходы к купированию этого состояния.

Цель и задачи исследования

Таким образом, **цель** исследования – анализ динамики активности глутатионпероксидазы (ГП) в тканях сердца крыс на фоне оксидативного стресса, вызванного механической травмой глаза.

Основными **задачами** нашего исследования являлись определение активности глутатионпероксидазы в динамике в тканях сердца интактных животных и крыс с экспериментальным окислительным стрессом, вызванным механическим воздействием на гематоофтальмический барьер, а также определение эффективности восстановления окислительно-восстановительного равновесия в организме с помощью применения различных видов терапии травмы глаза.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на клинически здоровых беспородных белых половозрелых крысах мужского пола восьмимесячного возраста, массой 190–210 г в количестве 150 штук, которые содержались в стандартных условиях в виварии при свободном доступе к воде и пище.

Все животные были поделены на 5 групп по тридцать крыс в каждой группе.

Активность глутатионпероксидазы в тканях сердца исследовали до начала опыта, а также на 1, 3, 5, 7 и 14 сутки эксперимента определяли по накоплению окисленного глутатиона [7]. Подробная методика постановки эксперимента представлена нами в предыдущей статье [8].

Полученные результаты подвергали статистической обработке методами непараметрического статистического анализа.

Основные результаты

Динамика активности глутатионпероксидазы (Me) в тканях сердца крыс представлена на рис. 1.

Согласно представленному рисунку установлено, что у интактных крыс активность ГП на протяжении всего опыта была примерно на одном уровне и соответствовала физиологической норме. У животных 2 группы с индуцированным оксидативным стрессом путем механической травмы глаза на протяжении всего эксперимента активность ГП интенсивно снижалась.

У животных третьей группы с индуцированным оксидативным стрессом путем механического воздействия на гематоофтальмический барьер и стандартной терапией механической травмы глаза также наблюдается снижение активности ГП в тканях сердца до 7 суток опыта, однако к окончанию эксперимента, на 14 сутки, активность фермента достигла физиологической нормы и была сопоставима с исходным значением.

В 4 группе крыс, с индуцированным оксидативным стрессом и его купированием стандартной терапией механической травмы глаза с добавлением кверцетина наблюдалось менее интенсивное снижение активности ГП до 7 суток опыта, а на 14 сутки активность фермента в тканях сердца была чуть выше начального значения, но также соответствовала физиологической норме.

В пятой группе животных с механической травмой глаза и терапией исключительно кверцетином также наблюдалось

снижение активности ГП вплоть до 14 суток, почти так же интенсивно, как у животных с травмой без терапии.

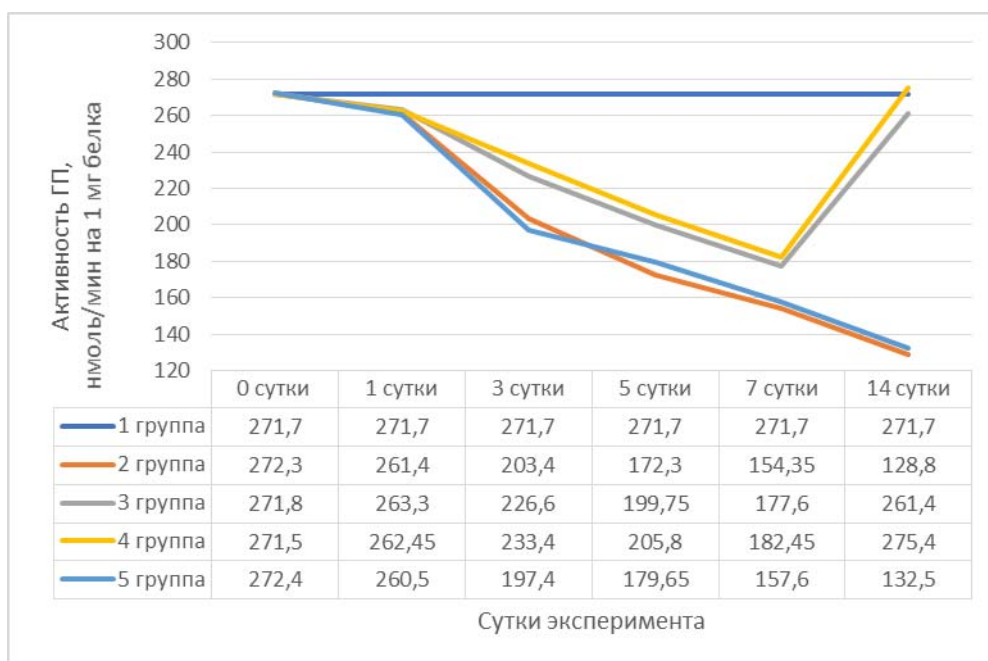


Рис. 1. Динамика активности глутатионпероксидазы в тканях сердца крыс при оксидативном стрессе, вызванном механической травмой глаза

Полученные результаты были обработаны путем непараметрического статистического анализа с целью установления достоверности различий в изучаемых группах с использованием критериев Вальда – Вольфовица, Колмогорова – Смирнова и Манна – Уитни (табл. 1).

По данным, представленным в таблице, выявлено, что активность ГП в тканях сердца крыс всех экспериментальных групп, начиная с 1 суток эксперимента и до конца опыта, отличается от активности фермента у интактных животных.

Обсуждение

При механическом повреждении глаза, согласно результатам многочисленных исследований, возникает воспалительный

процесс, обусловленный рядом защитных механизмов, одним из которых является гематоофтальмический барьер. Его повреждение сопровождается аутоиммунными реакциями и развитием стрессорной иммуносупрессии. Отчасти ее выраженность обусловлена стрессом утраты информационно важного органа. Как правило, ранний период (24–48 ч) сопровождается иммунодепрессией, тревогой и адаптационным синдромом. Все эти факторы, наряду с механической травмой, индуцируют и стимулируют оксидативный стресс, усугубляющий тяжесть патологического процесса. При этом оксидативный стресс становится одним из важнейших факторов осложняющий процесс терапии глаза [9].

Таблица 1. Статистический анализ динамики активности ГП в тканях сердца крыс на фоне оксидативного стресса, индуцированного механической травмой глаза

Сутки	Группы	Статистический тест	Критерий	Значение p
0 сутки	1 и 2	Манна – Уитни	U = 268,5000	0,007451
			Z = -2,67598	
		Колмогорова–Смирнова	Max Neg Differnc = -0,400000	< 0,025
			Max Pos Differnc = 0,00	
		Вальда – Вольфовица	Z = -0,781246	0,434659
			Z adjstd = 0,651038	0,515022
	1 и 3	Манна – Уитни	U = 288,5000	0,017299
			Z = -2,38029	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = -0,400000	< 0,025
			Max Pos Differnc = 0,033333	
		Вальда – Вольфовица	Z = -2,08332	0,037223
			Z adjstd = 1,953114	0,050807
	1 и 4	Манна – Уитни	U = 391,5000	0,391171
			Z = 0,857497	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = -0,133333	> 0,10
			Max Pos Differnc = 0,200000	
		Вальда – Вольфовица	Z = 0,00	1,000000
			Z adjstd = -0,130208	0,896402
	1 и 5	Манна – Уитни	U = 289,5000	0,018006
			Z = -2,36551	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = -0,333333	< 0,10
			Max Pos Differnc = 0,00	
		Вальда – Вольфовица	Z = -0,781246	0,434659
			Z adjstd = 0,651038	0,515022
1 сутки	1 и 2	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 3	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 4	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 5	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000

Сутки	Группы	Статистический тест	Критерий	Значение p
3 сутки	1 и 2	Манна – Уитни	U = 0,000	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 3	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 4	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 5	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
5 сутки	1 и 2	Манна – Уитни	U = 0,000	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 3	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 4	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 5	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000

Сутки	Группы	Статистический тест	Критерий	Значение p
7 сутки	1 и 2	Манна – Уитни	U = 0,000	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,0000	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 3	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 4	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 5	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
14 сутки	1 и 2	Манна – Уитни	U = 0,000	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,0000	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 3	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 4	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = -6,64560	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = -1,00000	< 0,001
			Max Pos Differnc = 0,00	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000
	1 и 5	Манна – Уитни	U = 0,00	0,000000
			Z = 6,645599	
		Колмогорова – Смирнова	Max Neg Differnc = 0,00	< 0,001
			Max Pos Differnc = 1,000000	
		Вальда – Вольфовица	Z = -7,55204	0,000000
			Z adjstd = 7,421834	0,000000

Глутатионпероксидаза, как один из ферментов антиоксидантной системы, активно вовлекается в борьбу с образующимися частицами и ее активность в тканях снижается. В таком случае применение антиоксиданта кверцетина, имеющего доказанную эффективность при лечении хронических заболеваний глаза, за счет способности быть донатором водорода, гасителем синглетного кислорода, хелатором ионов металла, активатором антиоксидантных ферментов вполне оправдано [10]. В целом, по результатам эксперимента установлено, что применение помимо стандартной тера-

пии механической травмы глаза инъекций кверцетина наиболее эффективно купирует оксидативный стресс и нормализует активность ГП в тканях сердца.

Заключение

Активность глутатионпероксидазы в тканях сердца крыс при оксидативном стрессе, вызванном механическим воздействием на гематоофтальмический барьер, наиболее эффективно стабилизируется при стандартной терапии механической травмы глаза с добавлением кверцетина в виде инъекций.

Литература / References

- 1 Endothelial disfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress / H. Cai, D.G. Harrison // *Circ Res.* – 2000. – Vol. 87. – P. 840–844.
- 2 Vliyaniye biooksidanta gistoxroma na povrezhdeniya miokarda pri reperfuzionnoj terapii u bol'ny'x infarktom miokarda / G.A. Bujmov [i dr.] // *Terapevt. Arxiv.* – 2002. – № 8 (74). – S. 16–21.
- 3 Lankin V.Z., Tikhaze A.K. Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease // Tomasi A, Özben T, Skulachev VP, editors. *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects.* Vol. 344. IOS Press; Amsterdam: 2003. pp. 218–231. (NATO Science Series).
- 4 Oxidative stress and nitric oxide pathway in adult patients who are candidates for cardiac surgery: patterns and differences / V. Cavalca [et al.] // *Interact. Cardio-Vasc. Thorac. Surgery.* – 2013. – Vol. 17, № 6. – P. 923–930.
- 5 Antioksidanty – citoprotektory v kardiologii / A.P. Golikov [i dr.] // *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika.* – 2004. – № 6 (2). – S. 66–74.
- 6 Svobodnoradikal'ny'e processy v norme i pri zabolevaniyax serdechno-sosudistoj sistemy / V.Z. Lankin, A.K. Tixaze, Yu.N. Belenkov. – M., 2000. – 260 s.
- 7 Kamyshnikov V.S. *Spravochnik po kliniko-bioximicheskim issledovaniyam i laboratornoj diagnostike.* – Moscow: Izd. MEDpress-inform, 2009.
- 8 Pavlova O.N., Gulenko O.N., Karimova R.G., Devyatkin A.A., Toropovskij A.N. Issledovanie dinamiki aktivnosti katalazy v syvorotke krovi kry's pri mexanicheskom vozdejstvii na gematooftal'micheskiy bar'er // *Mezhdunarodnyj nauchno-issledovatel'skij zhurnal.* – 2020. – № 5 (95), chast' I, maj. – S. 153–158.
- 9 Pavlova O.N., Simakova S.A. Priroda oksidativnogo stressa i sposoby ego korrekcii / O.N. Pavlova, S.A. Simakova // *Mediko-fiziologicheskie problemy ekologii cheloveka: materialy IV Vserossijskoj konferencii s mezhdunarodny'm uchastiem (26–30 sentyabrya 2011 g.).* – Ulyanovsk: UIGU, 2011. – S. 244–246.
- 10 Mixejceva I.N., Men'shnikova E.B., Lankin V.Z., Zenkovi N.K. Vozmozhnosti i perspektivy primeneniya bioflavonoidov v lechenii zabolevanij glaza // *Oftalmologicheskij zhurnal.* – 2015. – № 2. – S. 62–67
- 11 Mixejceva I.N., Men'shnikova E.B., Lankin V.Z., Zenkovi N.K. Okislitel'nyj stress. Prooksidanty i antioksidanty. – Moscow: Slovo, 2006. – 553 s.

Авторская справка

**Девяткин Анатолий
Анатольевич**

доктор медицинских наук, научный сотрудник, ООО «ТестГен», Ульяновск, Россия

**Борискин Павел
Викторович**

кандидат медицинских наук, доцент кафедры морфологии и патологии, Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

**Гуленко Ольга
Николаевна**

кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры «Биомедицинская безопасность на транспорте», СамГУПС, Самара, Россия

**Павлова Ольга
Николаевна**

доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой «Биомедицинская безопасность на транспорте», СамГУПС, Самара, Россия

**Леонов Виктор
Валериевич**

ассистент кафедры морфологии и патологии, Медицинский университет «Реавиз», Самара, Россия

**Каримова Руфия
Габдельхаевна**

доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и патологической физиологии, Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», Казань Россия

Статья поступила 17.09.2020
Одобрена после рецензирования 31.09.2020
Принята в печать 13.10.2020

Received September, 17th 2020
Approved after reviewing September, 31st 2020
Accepted for publication October, 13th 2020