

О.Ю. КОНЕВА, В.Ю. АФОНИН, С.Е. ДРОМАШКО

ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»,
ул. Академическая, 27, Минск-72
E-mail: koneva@tut.by

**ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ
КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА
МАНТИЙНОЙ ЖИДКОСТИ
И СПЕКТРА
ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ
ПРИЗНАКОВ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
ПОВРЕЖДЕНИЙ ГЕМОЦИТОВ
*LYMNAEA STAGNALIS***



Были проведены цитологические исследования возрастных изменений в мантийной жидкости моллюсков *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata), полученных от животных природной популяции затоки реки Припять (Республика Беларусь, Гомельская область). Обнаружено, что процентное соотношение выделенных типов клеток мантийной жидкости в выбранный возрастной период не изменяется. В процессе старения меняется соотношение клеток с различными морфологическими признаками гибели. Наблюдается тенденция к увеличению общего уровня гибнущих клеток.

© О.Ю. КОНЕВА, В.Ю. АФОНИН, С.Е. ДРОМАШКО, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 6

Введение. В научной литературе можно отметить разные подходы к изучению клеточного состава мантийной жидкости (гемолимфы) моллюсков. Существуют цитохимические, цитогенетические, иммунологические и другие методы, позволяющие описать качественно и количественно клеточный состав. Например, Russo et al. [1] в мантийной жидкости *Lymnaea palustris* (пресноводный легочный брюхоногий моллюск) по цитохимическим критериям выделили три популяции циркулирующих гемоцитов: круглые клетки, гиалиноциты и гранулоциты (round cells, hyalinocytes, granulocytes).

Использование моноклональных антител, специфических для гемоцитарных популяций мидий *Mytilus edulis*, позволило выявить три группы клеток: 1) базофильные гранулярные гемоциты; 2) базофильные гранулярные и гиалиновые клетки; 3) эозинофильные гранулярные клетки. Были также получены неселективные антитела, окрашивающие все гемоциты. Авторы отметили, что на личиночных стадиях моллюска преобладающей была реакция с неселективными антителами [2].

Исследования с использованием мышинных моноклональных антител LS1 выявили две популяции циркулирующих гемоцитов брюхоножного моллюска *Lymnaea stagnalis*. Соотношение LS1-положительных (LS1+) и LS1-отрицательных (LS1-) субпопуляций различалось у юных и взрослых животных. Эти субпопуляции также отличались пролиферативной и фагоцитарной активностью, содержанием лизосомального фермента. LS1+ гемоциты молодых и взрослых животных, как отметили авторы, имеют морфологию, характерную для иммунных клеток [3].

В одном из ультраструктурных исследований гемоцитов взрослых *Lymnaea truncatula* было обнаружено преобладание распластанных клеток (spreading cells) на различных стадиях дифференцировки. Авторы предположили, что несколько круглых клеток могут представлять отдельную популяцию гемоцитов. Выявлено, что распластанные клетки примечательны тем, что синтезируют пероксидазу, которая хранится в секреторных гранулах [4].

Во многих работах, проводимых на гемоцитах моллюсков, вообще не учитывался разнородный клеточный состав гемолимфы [5].

Не встречается в литературе характеристика динамики в онтогенезе клеточной гибели у

моллюсков, описание ее морфологических проявлений, например таких, как кариорексис — *karyorhexis* (*karyon* — орех, *hexis* — разрыв) — распад ядра клетки на глыбки; клазматоз (клазмацитоз, цитоклазия) — *klasmatos* (*klasma* — обломок, фрагмент) — формирование отшнуровывающихся фрагментов цитоплазмы клетки, затем отделяющихся от нее [6, 7]; голые ядра; апоптотические тела и др.

Мы исследовали морфологию клеточного состава мантийной жидкости (при стандартном способе окрашивания препаратов по методу Гимза) моллюска *Lymnaea stagnalis* и спектр морфологических признаков клеточной гибели его гемоцитов. Явные признаки старения организма данных животных отмечаются в возрасте около 250 дней [8] и связывают их в первую очередь со снижением репродуктивной активности. Поэтому для наблюдений нами был выбран именно этот период. Целью работы являлось изучение возможных возрастных изменений цитоморфологических параметров животных в выбранный возрастной период.

Материалы и методы. Объектом исследования послужили потомки моллюсков *Lymnaea stagnalis* природной популяции затоки реки Припять Гомельской области Беларуси, выращенные в лабораторных условиях. Из общей когорты наблюдаемых животных (38 особей) в настоящей работе анализировали только моллюски, достигшие возраста 481 день. В ходе работы было проведено четыре серии экспериментов с промежутком в 2,5–3,5 месяца. К началу экспериментов (весна) возраст живот-

ных составлял 8 месяцев, или 240 дней. К осени (481 день) выжило только 14 особей.

Мы проводили цитоморфологический анализ клеток мантийной жидкости данной группы ($n = 14$) животных в разные возрастные периоды. Исследовали клеточный состав среды мантийной жидкости, спектр и уровень морфологических признаков повреждений клеток, находящихся в ней. Анализировали изменение этих показателей с возрастом.

Мантийную жидкость собирали в пробирки, клетки фиксировали холодным этанолом. Закрытые пробирки хранили при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Перед центрифугированием в пробирки за 1 сут добавляли ледяную уксусную кислоту. Конечное соотношение спирт : кислота составляло 3 : 1. Цитологические препараты изготавливали методом раскапывания на замороженные предметные стекла, которые затем высушивали и окрашивали по Гимза. Данные обрабатывали с помощью пакета Statistica 6.0.

Исследуемые параметры сравнивали в двух группах — моллюсков более молодого возраста и животных более старшего возраста.

Результаты исследований и их обсуждение. В мантийной жидкости моллюсков *Lymnaea stagnalis* наблюдались следующие морфологические типы клеток.

1. *Клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (ЯЦС) (лейкоцитоподобные)*. Эти клетки в большинстве своем имеют достаточно правильную округлую форму. Ядро крупное, круглое либо бобовидное базофильной окраски, иногда с легким эозинофильным оттенком, характеризуется выраженной зер-

Таблица 1

Процентное содержание различных типов клеток в мантийной жидкости моллюсков в разные возрастные периоды

Возраст животных, дни	Группа животных	Клетки с высоким ЯЦС	Клетки с низким ЯЦС	2, 3, 4-ядерные клетки	Вытянутые клетки	Сферические структуры, напоминающие апоптотические тела, % от общего количества клеток	Преобладающий тип скоплений, доля клеток в скоплениях, % от общего количества клеток с высоким ЯЦС
		% от общего количества клеток					
240 (весна)	Припять $n = 14$ (1434 клетки)	97,61 ± 0,72	2,39 ± 0,72	7,28 ± 2,45	2,23 ± 1,43	0,09 ± 0,09 *	Крупные 17,90 ± 7,29
481 (осень)	Припять $n = 14$ (1483 клетки)	97,76 ± 0,85	2,24 ± 0,85	3,76 ± 0,77	0,98 ± 0,54	6,74 ± 4,82 *	Мелкие 8,36 ± 2,58

* $p < 0,05$.

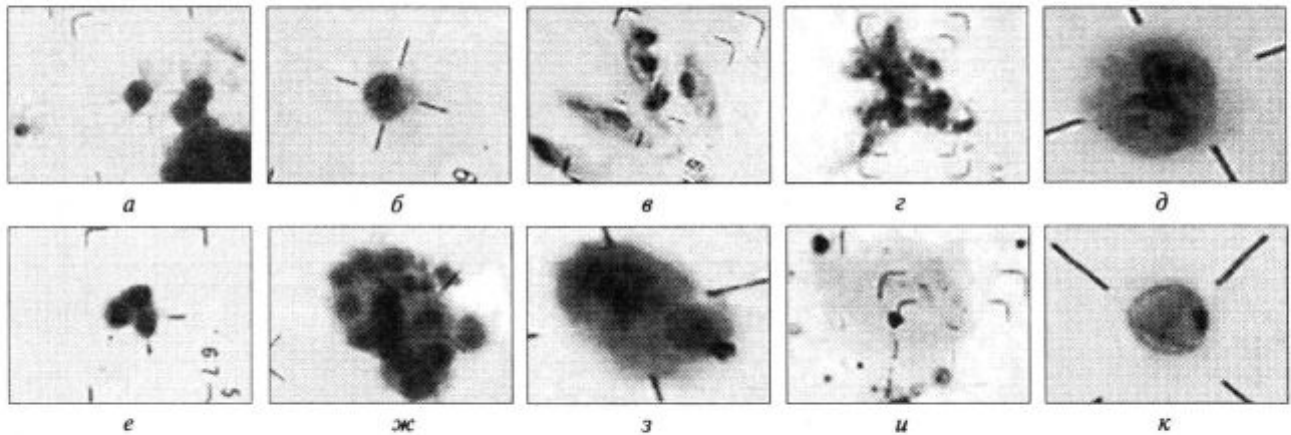


Рис. 1. Типы клеток, представленные в мантийной жидкости моллюска *Lymnaea stagnalis*: а, б — круглые клетки ($\times 133,3$; $\times 166,7$); в, з — вытянутые клетки ($\times 133,3$; $\times 116,7$); д — двухъядерная клетка ($\times 200$); е — мелкое скопление круглых клеток ($\times 116,7$); ж — крупное скопление круглых клеток ($\times 166,7$); з — клетка с обширной цитоплазмой ($\times 200$); и, к — сферические структуры ($\times 116,7$; $\times 200$)

нистостью. Окраска ядра может быть разной по интенсивности (рис. 1, а, б). Объем цитоплазмы в клетке мал (1/3—1/4 от объема клетки), тонкий ободок вокруг ядра (высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение). Контуры клетки могут быть ровные, четкие, а могут быть размытые, «хвостатые» или «звездчатые» (spreading cells [5]). Размер клеток также варьирует (от 6 до 9 мкм). В клетках иногда можно наблюдать вакуоли (в мелких интенсивно окрашенных клетках).

Достаточно часто встречаются скопления круглых клеток (табл. 1), в которых видны, большей частью, только интенсивно окрашенные ядра. Мелкие скопления в основном представлены тремя клетками (реже — 4—5) (рис. 1, е). Крупные скопления включают до 30 клеток (иногда больше) (рис. 1, ж). Крупные скопления имеют шаровидную форму.

В мантийной жидкости встречаются вытянутые клетки. Они расположены в основном скоплениями (чаще всего по пять клеток и больше), редко — поодиночке. Эти клетки (рис. 1, в, з) имеют удлиненную форму, овальное или грушевидное ядро с равномерной крупной зернистостью. Окраска цитоплазмы неравномерная, по контуру клетка более интенсивно окрашена. Контур и ядра, и цитоплазмы неровный. Скопления таких клеток всегда имеют вытянутую форму (направление вытянутости скоплений совпадает с направлением вытянутости клеток в них). Вытянутые

клетки напоминают по внешнему виду круглые клетки, когда последние обладают крупными размерами и большим ядром с четкой зернистостью. Единственное различие между вытянутыми и круглыми клетками заключается в форме. Удлиненная форма клеток в скоплениях и поодиночке, вероятно, является следствием лабильности цитоскелета у таких клеток, который легко деформируется.

Менее крупные круглые клетки с интенсивно (темно-синим) окрашенным ядром имеют более устойчивый цитоскелет и собираются в шаровидные скопления по три клетки и более.

В этой группе встречаются двухъядерные клетки (рис. 1, д). Они также круглой формы, имеют два различных ядра, которые часто неодинаковы по размеру. Есть клетки, содержащие и три, и четыре ядра или, возможно, сегменты ядра, также часто неодинаковых размеров, что может указывать на наличие процесса amitosis или явления полиплоидии в гемоцитах [9].

2. Клетки с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением (10—12 мкм). Такие клетки обычно характеризуются четкими правильными округлыми или овальными контурами (рис. 1, з). Цитоплазма неравномерная по окраске, обладает базофилией, что может свидетельствовать об интенсивном синтезе белка [10].

Ядро круглое, небольшое — 3—3,5 мкм (немного больше половины ядра круглых клеток) (рис. 1), занимает приблизительно 1/5

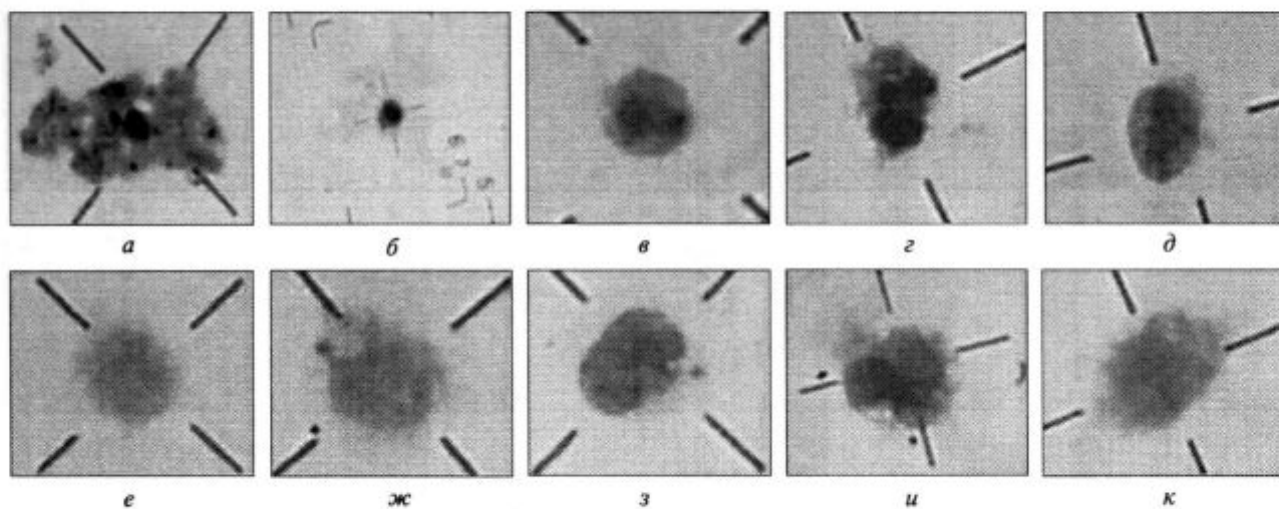


Рис. 2. Морфологические признаки гибели гемоцитов моллюска *Lymnaea stagnalis*: а, б — кариорексис ($\times 200$; $\times 133,3$); в, г — апоптотические тельца ($\times 200$); д — голое ядро ($\times 200$); е, ж — цитоплазматические фрагменты ($\times 200$); з — клетка с микроядром ($\times 200$); и, к — вакуолизация цитоплазмы ($\times 200$)

объема клетки (низкое ядерно-цитоплазматическое соотношение), в основном равномерно базофильно окрашено.

У некоторых моллюсков встречаются структуры размером 3—5 мкм (рис. 1, и, к), подобные апоптотическим телам у других видов животных. Они правильной круглой формы, часто выглядят объемно (в виде сферы). Имеют ровный, четкий контур. Цитоплазма их прозрачная с плотной толстой мембраной. Немного в смещении от центра клетки либо непосредственно около мембраны цитоплазмы располагается мелкое ядро эозинофильной окраски. В другой экспериментальной группе животных мы наблюдали данные структуры не только поодиночке, но и целые поля из таких апоптотических структур, а также непосредственно картину образования сферических апоптотических тел из клеток (неопубликованные данные).

Таким образом, выделены следующие типы клеток: 1) клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (подобны лейкоцитам человека), среди них встречаются клетки правильной круглой формы с крупным бобовидным ядром и небольшим ободком цитоплазмы, вытянутые клетки и двухъядерные (иногда 3—4-ядерные); 2) клетки с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением (обширная цитоплазма и относительно небольшое ядро).

С возрастом клетки становятся менее четкими: цитоплазма становится менее прозрачной, приобретает базофильно окрашивающуюся сетчатую структуру, поэтому ядро четко не видно, оно имеет размытый, сливающийся с цитоплазмой вид. Контур цитоплазмы также становится размытым, приобретает звездчатую форму (сравните рис. 1, а и рис. 1, б, старая и молодая клетки соответственно).

Процентное содержание выделенных типов клеток в мантийной жидкости в разные возрастные периоды животных изучаемой популяции приведено в табл. 1.

По критерию Вилкоксона для зависимых (связанных) выборок (Wilcoxon matched pair test) не существует статистически значимых различий между показателями табл. 1 у моллюсков одной и той же популяции в разные возрастные периоды ($p > 0,05$), кроме как по уровню сферических структур ($p = 0,017$). Если в более ранний возрастной период (весна) такие структуры были обнаружены только у одной особи из выборки, то к осени они обнаружены у значительно большего числа животных и в значительно больших количествах.

Использование критерия Вилкоксона не позволило обнаружить статистически значимые различия (возможно, из-за больших колебаний в индивидуальных значениях показателя) по уровню двухъядерных клеток в разные возрастные периоды, но выявлена тенденция

к уменьшению этого показателя с возрастом (табл. 1). Это указывает на более низкую пролиферативную активность клеток моллюсков в более поздний возрастной период или связано с затуханием этой активности к осени.

Такая же тенденция характерна для показателя доли вытянутых клеток, а также для показателя доли клеток в скоплениях. Процент клеток, находящихся в скоплениях, с возрастом заметно снизился. К тому же наблюдается уменьшение объема скоплений клеток с возрастом, что может свидетельствовать об изменении каких-то качественных характеристик самих клеток, например, их адгезивных свойств.

Морфологические признаки гибели отмечали только в лейкоцитоподобных (круглых) клетках. Именно эти клетки составляют существенную долю всех клеток мантийной жидкости (табл. 1). Наблюдали следующие признаки гибели.

1. *Апоптотические тельца* представлены в основном в виде фрагментов цитоплазмы, в которых содержатся глыбки хроматина разного размера и формы (рис. 2, в, з). Некоторые апоптотические тельца были представлены в виде «маленькой клетки»: небольшое круглое ядро с тонким ободком цитоплазмы (1/3 или 1/4 объема нормальной клетки).

2. *Голые ядра* наблюдали достаточно часто. Они имеют размер в 1/3—1/4 часть ядра клетки; форма круглая или овальная; интенсивно окрашены (рис. 2, д). Также встречались фрагменты ядер, которые тоже были интенсивно окрашены.

3. *Цитоплазматические фрагменты*, по-видимому, результат явления отшнуровывания

части цитоплазмы (клязматоз или цитоклазия), обладают размером практически круглой клетки, но без ядра (рис. 2, е, ж). Форма цитоплазматических фрагментов достаточно правильная, круглая. Данные структуры имеют легкую голубоватую окрасенность. Наличие безъядерных цитоплазматических структур может также указывать на возможность кариолизиса или энуклеации (выталкивание ядра из клетки).

4. *Микроядра* встречались различного размера (рис. 2, з) [11]. Чем мельче микроядро, тем интенсивней оно было окрашено. Окраска чуть темнее клеточного ядра или, если микроядро крупное, — практически в тон с ним.

5. *Вакуолизация цитоплазмы*. Изредка встречались клетки, вакуолизованные по краю цитоплазмы (пенистая цитоплазма) (рис. 2, и, к). Ядро в таких клетках четко не просматривается. Оно имеет размытый вид, предполагающий распад ядерных структур.

Процентное распределение перечисленных отдельных признаков гибели клетки внутри общей совокупности (100 %) морфологических признаков повреждений клеток у изучаемой группы животных в различные возрастные периоды представлено на рис. 3.

На представленных диаграммах видно, что соотношение различных морфологических типов проявления гибели клетки с возрастом изменилось. Наиболее заметные изменения произошли в отношении клязматоза. Доля этого признака в общей совокупности признаков значительно возросла при старении моллюсков на фоне уменьшения практически всех остальных типов проявления гибели клетки. Также

Таблица 2

Морфологические проявления гибели клеток у моллюсков *Lymnaea stagnalis* в разные возрастные периоды

Возраст животных, дни	Группа животных	Клетки с признаками кариорексиса	Апоптотические тельца	Голые ядра	Клязматоз	Микроядра	Вакуолизация цитоплазмы	Доля признаков гибели в совокупности
240	Припять $n = 14$ (1434 клетки)	$1,09 \pm 0,55$	$0,53 \pm 0,29$	$2,75 \pm 1,25$	$3,68 \pm 1,88$	$0,36 \pm 0,2$	0,00*	$8,41 \pm 2,54$
481	Припять $n = 14$ (1483 клетки)	$0,53 \pm 0,22$	$0,87 \pm 0,27$	$2,61 \pm 0,62$	$8,48 \pm 2,70$	$0,14 \pm 0,09$	$0,68 \pm 0,28^*$	$13,31 \pm 2,77$

* $p < 0,05$.



Рис. 3. Распределение различных признаков гибели клетки внутри общей совокупности (100 %) признаков повреждений клеток у животных рассматриваемой выборки в различные возрастные периоды: а — 240 дней (весна); б — 481 день (осень)

наблюдали клетки с вакуолизацией цитоплазмы, которые не обнаруживали у животных в более раннем возрасте. Природа явления увеличения доли класматоза с возрастом требует дополнительного изучения.

Данные о процентном содержании различных морфологических типов проявления гибели клетки, приходящихся на общее количество клеток, в мантийной жидкости моллюсков в различные возрастные периоды представлены в табл. 2.

В изучаемой группе животных критерий Вилкоксона не выявил статистически значимых различий в значениях долей наблюдаемых признаков клеточной гибели в различные возрастные периоды ($p > 0,05$), кроме как по признаку вакуолизации цитоплазмы, где $p = 0,043$. Следует заметить, что числовые значения совокупной доли (и отдельно по признакам) проявлений клеточной гибели в разные возрастные периоды отличаются (табл. 2).

Как видно из табл. 2, имеется тенденция к снижению с возрастом содержания клеток с признаками кариорексиса, уменьшается доля микроядер. Все это может говорить о снижении с возрастом скорости клеточного оборота [12]. Увеличивается доля цитоплазматических фрагментов.

В период между осенней и зимней сериями эксперимента, т.е. к возрасту 535 дней, в выделенной группе погибло только одно животное. После зимней серии эксперимента погибли все остальные животные.

Моллюск, погибший к зиме (т.е. раньше всех в выделенной группе), не характеризовался какими-либо индивидуальными особенностями по изучаемым критериям. Можно отметить, что как в весенний, так и осенний периоды для него были характерны одни из самых высоких показателей по уровню клеток с признаками кариорексиса, по уровню одиночных ядер, цитоплазматических остатков, но наравне с другими отдельными особями. Из особенностей клеточного состава можно отметить один из наиболее высоких уровней сферических структур осенью. Наблюдали также слабовыраженную тенденцию к образованию скоплений клетками: весной у этой особи скопления не были обнаружены, к возрасту 481 день — в незначительном количестве.

Выводы. Выделено два морфологических типа клеток в мантийной жидкости моллюсков *Lymnaea stagnalis*: 1) клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением (подобны лейкоцитам человека). Среди них клетки с круглым крупным ядром и небольшим ободком цитоплазмы, вытянутые клетки и двухъядерные (иногда 3—4-ядерные); 2) клетки с низким ядерно-цитоплазматическим соотношением (обширная цитоплазма и относительно небольшое ядро). Процентное соотношение двух выделенных типов клеток с возрастом внутри рассматриваемой выборки животных не изменяется. Отмечена тенденция к изменению с возрастом соотношения внутри типа лейкоцитоподобных клеток (круглые, вытянутые, двухъядерные, доля клеток в скоплениях), но оно не обладает статистической значимостью. С возрастом меняется соотношение различных морфологических признаков гибели клетки внутри их совокупности, особенно это затрагивает такие признаки, как цитоплазматические фрагменты и вакуолизация цитоплазмы. Уровень проявления данных признаков повреждения клетки значительно возрастает при старении. Вместе с тем наблюдается тенденция к снижению количества микроядер и экспрессии кариорексиса среди

клеток мантийной жидкости в процессе старения моллюсков *Lymnaea stagnalis*. Дальнейшие цитологические исследования мантийной жидкости лабораторных моллюсков будут направлены на изучение и уточнение наблюдаемых механизмов гибели клеток мантийной жидкости моллюска *Lymnaea stagnalis* в разные возрастные периоды.

SUMMARY. The age-related changes in hemolymph cellular composition of snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata) obtained from individuals of a natural population (the river Pripyat, Gomel region, Belarus) as well as in the spectrum of cytomorphological traits of hemocyte genetic damages have been studied. The percentage of the distinguished hemolymph cell types during the chosen age period was not revealed to change. The percentage of cells with different morphological attributes of cell death varied during ageing. The tendency to increase in the total level of dying cells was observed.

РЕЗЮМЕ. Проведено цитологічні дослідження вікових змін в мантийній рідині молюсків *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata), отриманих від тварин природної популяції затоки р. Прип'ять (Республіка Беларусь, Гомельська обл.). Виявлено, що процентне відношення виділених типів клітин мантийної рідини у вибраний віковий період не змінюється. У результаті старіння змінюється співвідношення клітин з різними морфологічними ознаками загибелі. Спостерігається тенденція до збільшення загального рівня клітин, що гинуть.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Russo J., Lagadic L. Effects of parasitism and pesticide exposure on characteristics and functions of hemocyte populations in the freshwater snail *Lymnaea palustris* (Gastropoda, Pulmonata) // Cell Biol. and Toxicol. — 2000. — **16(1)**. — P. 15—30.
2. Dyrinda E.A., Pipe R.K., Ratcliffe N.A. Sub-populations of haemocytes in the adult and developing marine mussel, *Mytilus edulis*, identified by use of monoclonal

antibodies // Cell and Tissue Res. — 1997. — **289(3)**. — P. 527—536.

3. Dikkeboom R., Tijnagel J.M., Knaap W.P. van der. Monoclonal antibody recognized hemocyte subpopulations in juvenile and adult *Lymnaea stagnalis*: functional characteristics and lectin binding // Develop. and comparative immunol. — 1988. — **12(1)**. — P. 17—32.
4. Monteil J.F., Matricon-Gondran M. Structural and cytochemical study of the hemocytes in normal and trematode-infected *Lymnaea truncatula* // Parasitol. Res. — 1993. — **79(8)**. — P. 675—682.
5. Nunez P.E., Adema C.M., Jong-Brink M. de. Modulation of the bacterial clearance activity of haemocytes from the freshwater mollusc, *Lymnaea stagnalis*, by the avian schistosome, *Trichobilharzia ocellata* // Parasitology. — 1994. — **109** (Pt 3). — P. 299—310.
6. Методические рекомендации и медицинская лексика // [http://www.omsk-osma.ru/chairs/patan/metod/met1.doc] — 05.12.05.
7. Цитологическое исследование спинномозговой жидкости в клинико-диагностических лабораториях // [http://beatles.oko.ru/main.php3?p=30&paternid=&linkid=60853]— 26.12.05.
8. Janse C., Roest M. van der, De Jeu M., Boer H.H. Degeneration of CDCs and egg laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis* // Acta Biol. Hung. — 1995. — **46(2/4)**. — P. 229—239.
9. Barsiene J. Genotoxic impacts in Klaipeda Marine port and Butinge oil terminal areas (Baltic Sea) // Marine Environ. Res. — 2002. — **54(3/5)**. — P. 475—479.
10. Глушен С.В. Цитология и гистология : Конспект лекций. — Минск : БГУ, 2003. — 138 с.
11. Majone F., Brunetti R., Fumagalli O., Gabriele M., Levis A.G. Induction of micronuclei by mitomycin C and colchicine in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* // Mutat. Res. — 1990. — **244(2)**. — P. 147—151.
12. David R. Dixon, Audrey M. Pruski, Linda R.J. Dixon and Awadhesh N. Jha. Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview // Mutagenesis. — 2002. — **17(6)**. — P. 495—507.

Поступила 19.10.05