

В.П. Ляшенко, О.М. Пасічніченко

Модуляція електричних і скоротливих реакцій ізолюваних препаратів черевної аорти за умов гіперхолестеринемії та застосування антагоністів кальцію

В работе исследовались возможные механизмы связи мембранного потенциала эндотелия аорты и сократительной активности изолированных препаратов артерий в условиях длительной гиперхолестеринемии (ГХС) и использования антагонистов кальция. Показано, что реакции препаратов аорты на вазоактивные вещества в условиях ГХС зависят от изменений мембранного потенциала, связанных с электролитным состоянием и являются кальцийзависимыми. Особенно существенное восстановление мембранного потенциала и сократительной активности, измененных в условиях ГХС, наблюдалось в группе животных при использовании аспаркама.

ВСТУП

Функціонування серцево-судинної системи за умов гіперхолестеринемії (ГХС) має свої особливості. Відомо, що тривала ГХС викликає порушення системи кровообігу [2, 6–8, 10, 11] внаслідок переходу адаптаційного ефекту в ланцюг патогенезу. Вплив тривалої ГХС найбільшою мірою спостерігається в судинах: саме вони першими зазнають структурно-функціональних змін, які можуть проявлятися в модуляції скоротливої активності, що тісно пов'язана з електричними процесами. Відомо, що при стимуляції ендотеліальних клітин підвищується внутрішньоклітинна концентрація Ca^{2+} і модулюються електричні властивості ендотелію [1]. Зміни мембранного потенціалу (МП) ендотеліальних клітин впливають також на МП гладеньком'язових клітин (ГМК), оскільки мають з останніми міоендотеліальні електричні контакти [13]. За умов стресу посилюється кальцієвий обмін [1, 10, 12], а при тривалій ГХС можливим є порушення кальцієвого гомеостазу

і надмірне накопичення кальцію в тканинах. На цей час у щурів вплив тривалої стресіндукованої ГХС на електричну і скоротливу активність судин вивчено недостатньо. Зважаючи на те, що надходження Ca^{2+} у клітини за таких умов можуть значною мірою забезпечувати потенціалзалежні кальцієві канали, α_1 -адренорецептори або рецептори ренін-ангіотензинової системи.

Метою нашого дослідження було вивчення особливостей електричної активності ендотелію та скоротливих реакцій черевної аорти за умов тривалої стресіндукованої ГХС, а також ефектів застосування антагоністів кальцію.

МЕТОДИКА

Досліди проведено на лабораторних щурах-самцях віком (на початок експерименту) 2 міс. Всі тварини були поділені на групи. До першої групи ввійшли контрольні тварини (n= 9), до другої групи (n=12) – тварини, у яких моделювали ГХС за допомогою

© В.П. Ляшенко, О.М. Пасічніченко

обмеження життєвого простору до 80–100 см² на одну тварину і додавання до їжі кондиціонуючого фактора – NaCl з розрахунку 2 г/кг [9]. Всі наступні групи були представлені тваринами, які паралельно з утворенням ГХС отримували речовини, що перешкоджали підвищенню внутрішньоклітинної концентрації Ca²⁺ тим чи іншим шляхом. Так, тварини третьої групи (n=8) отримували ніфедипін (2 мг/кг на добу, який блокував потенціалзалежні кальцієві канали L-типу. Щури четвертої групи (n=7) отримували еналаприл (25 мг/кг на добу), який пригнічував активність ангіотензинперетворювального ферменту (АПФ) і зменшував синтез ангіотензину II. У тварин п'ятої групи (n=7) на фоні ендогенної ГХС пригнічували α₁-адренорецептори за допомогою празозину (1 мг/кг на добу). Тварини шостої групи (n=42) отримували додатково K⁺ і Mg²⁺ у складі калію-, магнію аспарагінату (1,75 г/кг на добу).

На 21-му тижні з початку експерименту тварин декапітували. Дослідження проводили на черевній аорті. МП ендотелію реєстрували методом перфорованого patch-clamp у режимі фіксації струму [4, 21]. Ацетилхолін додавали до суперфузуючого розчину у концентрації 2 мкмоль/л.

Скоротливу активність ізольованих препаратів черевної ділянки аорти реєстрували стандартним методом [3] за допомогою електрофізіологічного устаткування конструкторського бюро Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця. Вазоактивні речовини перфузували по проточній системі з постійною швидкістю 2–3 мл/хв у концентраціях: норадреналін – $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, адреналін – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, ацетилхолін – $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

Результати обробляли статистично методом парних порівнянь і оцінювали їх як вірогідні при P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Середнє значення мембранного потенціалу ендотеліальних клітин аорти щурів конт-

рольної групи становило $-43,80 \text{ мВ} \pm 1,32 \text{ мВ}$. Аплікація ацетилхоліну (2 мкмоль/л) викликала значну пролонговану гіперполяризацію ендотеліальних клітин з піком $-64,80 \text{ мВ} \pm 1,40 \text{ мВ}$ (рис. 1,а). Відмив ацетилхоліну призводив до повернення значень мембранного потенціалу до рівня потенціалу спокою. Ці результати узгоджуються з даними, що були отримані іншими дослідниками [4, 5, 17, 21].

У щурів з відтвореною стресіндукованою ГХС (друга група) МП клітин ендотелію аорти було зафіксовано на рівні $-41,60 \text{ мВ} \pm 0,75 \text{ мВ}$, тобто за цих умов спостерігалася незначна, але статистично вірогідна (P<0,05) деполяризація мембранного потенціалу ендотеліальних клітин, водночас значно зменшувалась амплітуда ацетилхолініндукованої гіперполяризації (рис. 1,б). За означених умов вона становила $-51,67 \text{ мВ} \pm 1,84 \text{ мВ}$.

Відомо, що ендотеліальні клітини аорти не містять потенціалзалежних кальцієвих каналів, тому досить несподіваними були отримані нами результати про те, що у щурів, які на фоні розвитку ендогенної ГХС приймали протягом 21 тиж антагоніст потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу ніфедипін, деполяризація мембрани зменшувалася: МП ендотеліальних клітин становив $-42,67 \text{ мВ} \pm 1,45 \text{ мВ}$. Тобто у щурів при відтворенні ГХС спостерігалася тенденція до збільшення МП: він наближався до значень, що були зареєстровані у тварин контрольної групи. Суперфузія зазначеного препарату розчином з додаванням ацетилхоліну викликала гіперполяризацію МП клітин ендотелію до $-64,50 \text{ мВ} \pm 0,99 \text{ мВ}$. Таким чином, пригнічення потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу сприяло практично повному відновленню електричної відповіді ендотелію аорти щурів з відтвореною ГХС. Можливо, що така ситуація є наслідком того, що ендотеліальні та ГМК у судинах є електрично зв'язаними [13, 22], і тому існує можливість, що дія ніфедипіну реалізується через ГМК і пере-

дається через міоендотеліальні контакти на ендотелій. Ніфедипін більш значуще впливав на ацетилхолініндуковану гіперполяризацію, ніж на мембранний потенціал за умов спокою, що, можливо, пов'язано з участю кальцію в процесах формування МП і вазоактивних функцій судин [14].

Відомо, що норадреналін, 5-НТ, ангіотензин II викликають деполяризацію і осциляції МП ендотелію інтактної аорти щура [22]. Як виявилось, більшість рецепторів до них теж розміщена не на ендотеліальних, а на ГМК аорти щура. У проведеному нами дослідженні після паралельного з розвитком ендогенної ГХС, тривалого пригнічення активності АПФ за допомогою еналаприлу, МП спокою ста-

новив $-43,33 \text{ мВ} \pm 1,21 \text{ мВ}$, тобто він практично не відрізнявся від такого інтактної аорти. Відповідь на вплив ацетилхоліну являла собою гіперполяризацію ендотелію до $-64,33 \text{ мВ} \pm 1,21 \text{ мВ}$. Наступна за гіперполяризацією реполяризація не перевищувала рівень МП спокою, тобто ацетилхолініндуковані електричні реакції ендотелію практично не відрізнялися від тих, що спостерігались у інтактному ендотелії. Отримані результати дають підставу думати, що ангіотензин II є важливим фактором, який сприяє пригніченню електричних реакцій ендотелію аорти за умов ГХС, і тому блокада АПФ мала потужну протекторну дію на ці реакції в умовах ендогенної ГХС.

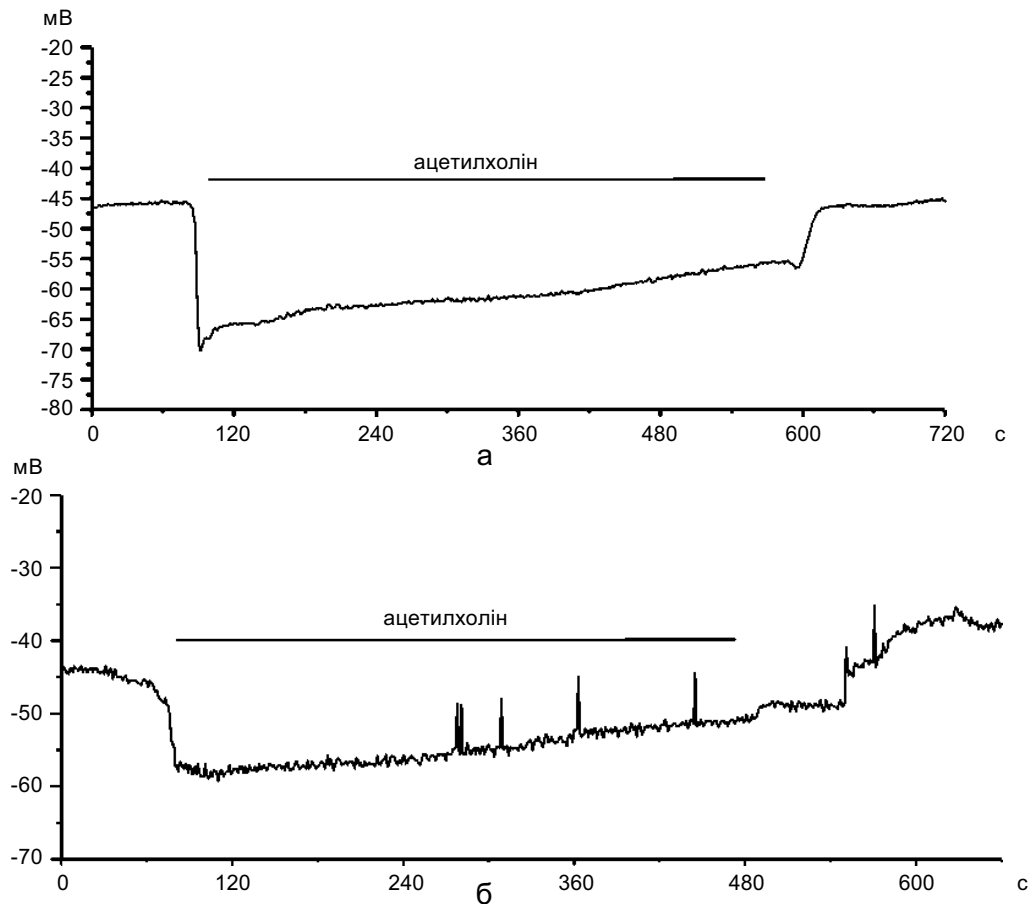


Рис. 1. Ацетилхолініндукована електрична відповідь інтактного ендотелію ізольованої аорти щурів контрольної групи (а) та після відтворення ГХС (б) на 21-му тижні дослідження. За віссю абсцис – час, с; за віссю ординат – рівень мембранного потенціалу, мВ

Після тривалого (21 тиж) пригнічення α_1 -адренорецепторів празозіном МП ендотеліальних клітин аорти становив $-43,50 \text{ мВ} \pm 0,65 \text{ мВ}$, тобто він практично не відрізнявся від такого ендотелію у інтактних щурів. Ацетилхолініндукована гіперполяризація становила в середньому $-66,25 \text{ мВ} \pm 1,49 \text{ мВ}$, що навіть перевищувало значення піка гіперполяризації ендотелію інтактною аорти. Надмірна активація α_1 -адренорецепторів при моделюванні ГХС виглядає логічною, якщо зважити, що остання зумовлена реакцією тварин на обмеження життєвого простору, тому пригнічення активності цих рецепторів вірогідно відновлювало не тільки МП, а й ацетилхолініндуковані електричні реакції ендотелію аорти, попереджуючи негативний ефект ГХС на них.

У щурів, які на фоні розвитку ендогенної ГХС отримували аспаркам, тобто додаткові Mg^{2+} і K^+ , МП ендотелію становив $-43,67 \text{ мВ} \pm 1,21 \text{ мВ}$, а пік ацетилхолініндукованої гіперполяризації – $-68,75 \text{ мВ} \pm 1,16 \text{ мВ}$ ($P < 0,05$). Отже, у тварин цієї групи, МП максимально наближався до його значення в інтактному ендотелії, а електричні реакції на ацетилхолін посилювались і були навіть більш вираженими, ніж в інтактній аорті.

Отже, зміни МП, що спостерігались у тварин, які на фоні ГХС приймали ніфедипін і еналаприл не були вірогідно значущими порівняно з результатами тварин, у яких моделювали ГХС без антагоністів кальцію. На відміну від них, у тварин, які на фоні тривалої ГХС приймали празозин і аспаркам, зміни МП клітин ендотелію були вірогідними ($P < 0,05$) і наближались до значень тварин контрольної групи.

Узагальнюючи результати цієї серії експериментів, слід зазначити, що моделювання ГХС протягом 21 тиж призводило до вірогідного, але незначного зниження МП ендотеліальних клітин аорти щурів. За цих умов значно зменшувалася реакція на аплікацію ацетилхоліном: гіперполяризація

була втричі меншою порівняно зі значеннями в контролі. При застосуванні ніфедипіну – блокатора потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу і еналаприлу – блокатора АПФ, відмічалася тенденція до відновлення МП і електричних реакцій ендотелію аорти. Деполяризація, яка спостерігалась у тварин при розвитку ГХС зменшувалась, а гіперполяризація на суперфузію ацетилхоліном – збільшувалась. У тварин, які на фоні ГХС приймали празозин і аспаркам, було зареєстровано вже вірогідне відновлення МП ендотелію як за умов спокою, так і за умов аплікації ацетилхоліном. Особливо значущими ці зміни були при застосуванні калій-, магній аспарагінату.

Дослідження ізольованих препаратів черевної аорти тварин контрольної групи показали їх розслаблення під дією ацетилхоліну ($1 \cdot 10^{-4}$ ммоль/л) на $1,4 \text{ мН} \pm 0,07 \text{ мН}$ від рівня вихідного напруження і їх скорочення з амплітудою $1,23 \text{ мН} \pm 0,1 \text{ мН}$ при дії адреналіну ($5 \cdot 10^{-5}$ ммоль/л). У безкальцієвому розчині ізольовані препарати тварин контрольної групи виявили аналогічні реакції на ацетилхолін і їх відсутність на адреналін (рис. 2,а). Велика кількість досліджень, проведених у цьому напрямку, показала, що вазоактивні речовини в безкальцієвому розчині можуть вивільнювати кальцій з внутрішньоклітинних запасників більшості ГМК клітин [18, 19]. Вивільнений кальцій не надходить знов до запасників, а виходить через мембрану з клітини [18, 20]. Такі кальцієві запасники ГМК різні за ємністю і швидкістю виходу кальцію [16, 24, 26]. Мабуть, саме тому ми і не спостерігали в безкальцієвому розчині ніяких реакцій препаратів на адреналін. Реакція на ацетилхолін не є кальційзалежною, а пов'язана зі струмом калію, що направлено з клітини. Тому така реакція в безкальцієвому розчині і не зазнає ніяких змін порівняно з тією, що спостерігалась у фізіологічному розчині Тірде.

У тварин з відтвореною ГХС, ізольовані препарати черевної аорти не давали стій-

кого тону і не відповідали на ацетилхолін і адреналін (рис. 2,б). Коливання тону могли бути наслідком нестабільної електролітної ситуації і пов'язаними з нею змінами МП, що склались за умов моделювання ГХС. Проведені нами експерименти показали, що в жодній із проб не було зафіксовано ніяких відповідей ні на ацетилхолін, ні на адреналін, що пов'язано зі стійкою деполаризацією МП клітин і порушенням електричних реакцій за умов тривалої ГХС.

Під час застосування ніфедипіну препарати черевної аорти скорочувалися на дію адреналіну на $1,7 \text{ мН} \pm 0,4 \text{ мН}$, на вплив ацетилхоліну ніяких реакцій не спостерігалось. На нашу думку, це може бути пов'язано з тим, що застосування ніфедипіну протягом 21 тиж призводило до зниження тону судин внаслідок блокування потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу. Тому така релаксована аорта показувала більшу силу скорочення на адrena-

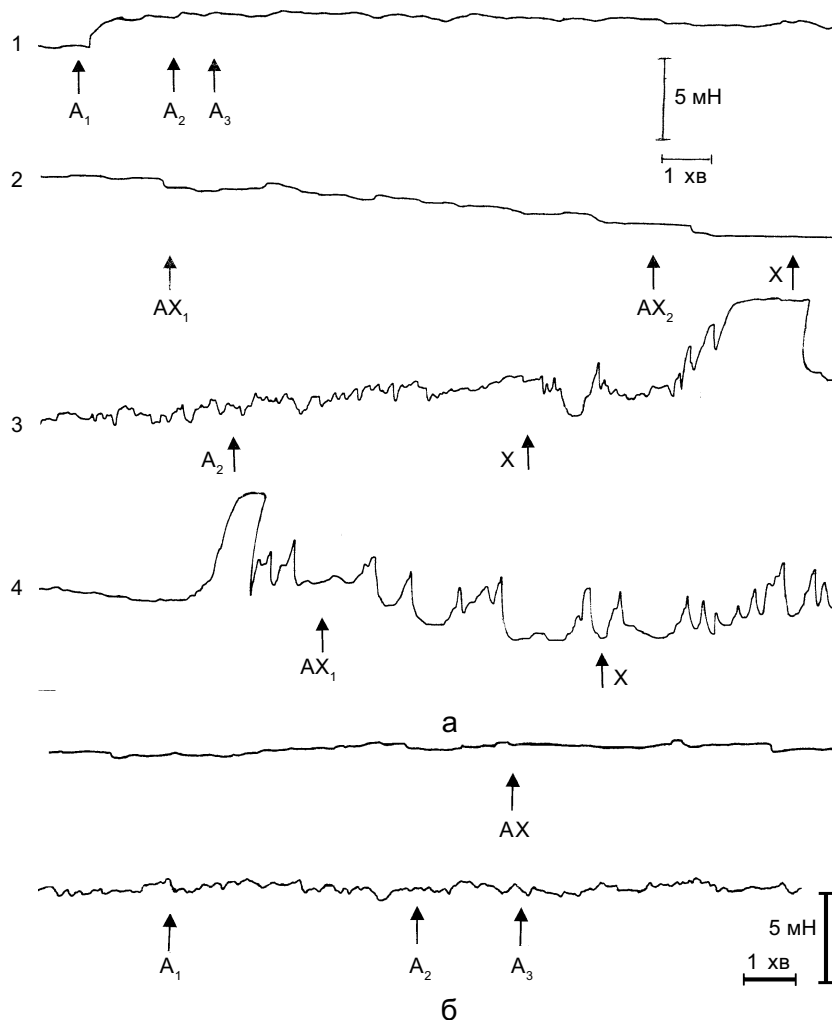


Рис. 2. Відповіді ізольованих препаратів черевної аорти шурів контрольної групи (а) та шурів з відтвореною гіперхолестеринемією (б) на дію вазоактивних речовин: 1, 2 – за умов перфузії нормальним розчином Тірде; 3, 4 – за умов перфузії безкальцієвим розчином. Стрілки – початок дії препарату. А₁ – адреналін ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/л); А₂ – адреналін ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л); А₃ – адреналін ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л); АХ₁ – ацетилхолін ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л); АХ₂ – ацетилхолін ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л); X – відмивання розчинів

лін і зовсім не розслаблювалася на застосування ацетилхоліну. З цієї ж причини ми не спостерігали ніяких реакцій на ацетилхолін у безкальцієвому розчині. В останньому не було реакцій і на адреналін, оскільки, як зазначалося вище, скорочення ГМК є кальційзалежними.

Застосування блокатора АПФ призвело до скорочення черевного відділу аорти з силою $0,75 \text{ мН} \pm 0,2 \text{ мН}$ і розслаблення на $1,0 \text{ мН} \pm 0,1 \text{ мН}$ під дією ацетилхоліну. Ймовірно, що така ситуація виникла внаслідок зменшення вироблення ангіотензину II і альдостерону, що призводило до підвищення концентрації калію в плазмі. Тому вихідний струм калію з клітини був зменшеним. Наслідком цього могли бути два явища – зменшення розслаблення на ацетилхолін, що ми й спостерігали в своїх дослідженнях. По-друге, підвищення позаклітинної концентрації калію могло гіперполяризувати мембрану і зменшити, таким чином, реакцію на адреналін. Таке зменшення в наших експериментах становило 39% порівняно з контрольними значеннями.

При застосуванні, на фоні моделювання ГХС, блокатора α_1 -адренорецепторів – празозину, який тварини приймали протягом 21 тиж, не було зареєстровано жодної реакції ні на ацетилхолін, ні на адреналін.

Як у випадку з застосуванням ніфедипіну, празозін міг викликати стійке розслаблення судин. На фоні дилатації додаткових реакцій розслаблення на ацетилхолін не було зареєстровано. Відсутність реакцій на адреналін слід розглядати в комплексі ще з одним зареєстрованим нами фактом. У препаратів аорти тварин цієї групи після первинного розтягування спостерігалася фазна спонтанна активність з частотою $3,0 \pm 1,0$ скорочень за 1 хв (рис. 3). Під дією адреналіну ця активність підвищувалася до $6,0 \pm 1,0$ скорочень, а потім падала до 1–2 скорочень. Тобто спостерігалися фазні поодинокі скорочення, частота яких на фоні адреналіну збільшилася. Водночас тонічних тривалих скорочень на адреналін не було. Можливо, що така ситуація є відображенням функціональної значущості лігандзалежних каналів в аорті, щільність яких в цьому органі більша, ніж потенціалзалежних [15, 23, 25].

Щодо тварин, які на фоні ГХС приймали аспаркам, то скоротлива активність ізольованих препаратів аорти в основному наближалася до значень тварин контрольної групи. На дію адреналіну ці препарати скорочувалися з силою $1,5 \text{ мН} \pm 0,5 \text{ мН}$ і розслаблялися на дію ацетилхоліну з амплітудою $1,2 \text{ мН} \pm 0,3 \text{ мН}$. Тобто аспар-

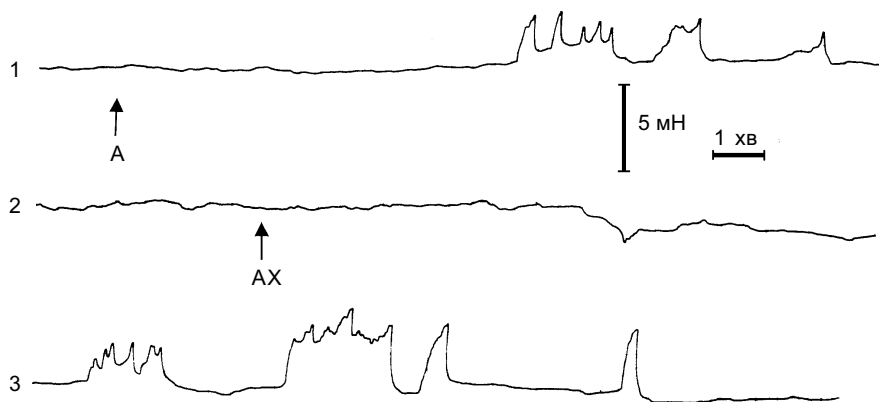


Рис. 3. Скоротливі реакції ізольованих препаратів черевної аорти щурів, які паралельно з відтворенням гіперхолестеринемії отримували празозин: 1 – реакція на адреналін (А) ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л); 2 – реакція на ацетилхолін (АХ) ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л); 3 – фазна спонтанна активність. Стрілки – початок дії певного препарату; X – відмивання розчинів

кам, який в рівній кількості містить іони калію і магнію, призводить до відновлення електролітної рівноваги і як наслідок – до відновлення МП, деполяризованого за умов моделювання ГХС. Дійсно, результати, отримані на ендотелії аорти шурів показали, що застосування аспаркаму вірогідно відновлювало МП клітин і їх реакцію на ацетилхолін, яка була більш сильною, ніж у контролі.

Отже, дослідження скоротливої активності ізольованих препаратів судин шурів за умов моделювання ГХС і застосування на цьому фоні антагоністів кальцію показали, що ці реакції на вазоактивні речовини залежать від змін МП, пов'язаних з електролітним станом і є кальційзалежними. Особливо суттєвим відновлення скоротливої активності, зміненої за умов ГХС, спостерігалось у групі тварин за умов застосування аспаркаму.

V. P. Lyashenko, O. M. Pasichnichenko

MODULATION OF ELECTRIC AND CONTRACTILE RESPONSES OF THE ENDOTHELIUM IN AORTA AT HYPERHOLESTERINEMIA AND TREATMENT WITH CALCIUM ANTAGONISTS.

Membrane potential of aorta's endothelium, contractile responses of isolated preparation of the abdominal aorta and their modulation with calcium antagonists were studied at hypercholesterinemia (HHS). Membrane potential has been observed to be slightly depolarized at HHS, and acetylcholine-induced electric and contractile responses were shown to be depressed. Calcium antagonists had positive effect on MP, electric and contractile responses of the preparations of the abdominal aorta of rats with HHS. The most pronounced protective effect of membrane potential and contractile responses at HHS was observed in rats after asparcam using.

Dnipropetrovsk National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдонин П. В., Ткачук В. А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. - М.: Наука, 1994. - 288 с.
2. Амосова Е. Н. Атеросклероз: некоторые факты о холестерине // Журн. практ. врача. - 1996. - №5. - С.34-38.
3. Блаттнер Р., Классен Х., Десперт Х., Дёринг Х. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц; Пер. с англ. - М.: Мир, 1983. - 208 с.
4. Бондаренко А. И., Сагач В. Ф. Модуляция мембранного потенциала клеток интактного эндотелия аорты

- морской свинки // Нейрофизиология – 1996. – 28, № 6. – С. 266.
5. Бондаренко О. И. Влияние блокаторов натрий-кальциевого обменника на ацетилхолиновую гиперполяризацию эндотелиальных клеток аорты шуров // Фізіол. журн. – 2004. – 50, № 1. – С. 31–38.
6. Климов А. И., Никульчева Н. Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. – СПб.: Питер, 1995. – 298 с.
7. Какауридзе Н. Г. Морфофункциональные показатели гистогематического барьера при экспериментальной гиперхолестеринемии // Лікар. справа. – 2001. – №2. – С.103–106.
8. Лопухин Ю.М., Арчаков А.И., Владимиров Ю.А., Коган Э. М. Холестериноз. - М.: Медицина, 1983. - 352 с.
9. Ляшенко В. П., Лукашов С.М., Зорова Ж. В., Політаєва В. І. Спосіб моделювання атеросклерозу // Промислова власність. – 2002. – Бюл. №1. – С. 4–81.
10. Пшенникова М. Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 2000. – №3. – С. 20–26.
11. Титов В. Н. Атеросклероз – патология полиеновых жирных кислот // Клин. лаб. диагностика. – 2001. – №1. – С. 3–9.
12. Физиология и патофизиология сердца: Пер. с англ. / Под ред. Н. Сперелакиса: В 2-х т. Т.1. – М.: Медицина, 1988. – 624 с.
13. Beny J. L., Paccica C. Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in the pig coronary artery // Amer. J. Physiol. Hern. Circulat. Physiol. – 1994. – 266. – P. H1465–H1472.
14. Biswas T. K. Endothelium, atherosclerosis and calcium channel blockers // J. Indian. Med. Assoc. – 2003. – 101, № 7. – P. 428–431.
15. Bolton T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle // Physiol. Rev. – 1979. – 59. – P. 606–718.
16. Casteels R., Droogmans G. Exchange characteristics of the noradrenaline sensitive calcium store in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery // J. Physiol. – 1981. – 317. – P. 263–279.
17. Chen G., Cheung D. W. Characterization of acetylcholine-induced membrane hyperpolarization in endothelial cells // Circulat. Res. – 1992. – 70. – P. 257–263.
18. Deth R., Casteels R. A study releasable Ca⁺⁺ fractions in smooth muscle cells of the rabbit aorta // J. Gen. Physiol. – 1977. – 69. – P. 401–416.
19. Deth R., Lynch C. J. Mobilization of a common source of smooth muscle Ca⁺⁺ by norepinephrine and methylxanthines // Amer. J. Physiol. – 1981. – 240. – P. C239–C247.
20. Droogmans G., Raeymaekers L., Casteels R. Electro- and pharmacomechanical coupling in the smooth muscle cells of the rabbit ear artery // J. Gen. Physiol. – 1977. – 70. – P. 129–148.
21. Marchenco S. M., Sage S. O. Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in

- intact rat aorta //J. Physiol. –1993. – **462**. – P. 735–751.
22. Marchenco S. M., Sage S. O. Smooth muscle cells affect endothelial membrane potential in rat aorta //Amer. J. Physiol. – 1994. – **267**. – P. H804–H811.
23. Mazanet R., Franzini-Armstrong C. Scanning electron microscopy of pericytes in rat muscle //Microvasc. – 1982. – **23**. – P. 361–369.
24. McCalden T. A., Bevan J. A. Sources of activator calcium in rabbit basilar artery //Amer. J. Physiol. – 1981. – **241**. – P. H129–H131.
25. Rhodin J. A. C. Architecture of the vessel wall. – In: Handbok of Physiology/Ed. D. F. Bohr A. P. Somlyo H. V. Sparks Jr. Sect. 2: The cardiovascular system. Vascular smooth muscle. Bethesda MD: American Physiological Society. – 1980. – **2**. – P. 1–32.
26. Van Breemen C., Siegel B. The mechanism of alfa-adrenergic activation of the dog coronary artery // Circulat. – 1980. – **241**. – P. 426–429.

Дніпропетров. нац. ун-т М-ва освіти і науки України

Матеріал надійшов до редакції 21.03.2005