

АПОПТОЗ У КЛІТИНАХ МАТКОВО-ПЛАЦЕНТАРНОЇ ДІЛЯНКИ ПРИ ЗАЛІЗОДЕФІЦИТНИХ АНЕМІЯХ ВАГІТНИХ

І.С.Давиденко, В.П.Пішак, М.Ю.Коломоєць, І.Й.Сидорчук, О.В.Пішак, І.Ф.Курченко

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

Резюме. Імуногістохімічними (метод TUNEL, визначення антигенів Вах, Vcl-XS, Vcl-2, Mcl-1, Vcl-XL, CD1a, CD3, CD4, CD8a, CD22, CD95) та гістологічними методами досліджено процеси апоптозу у клітинах матково-плацентарної ділянки при залізодефіцитній анемії вагітних. У клітинах цитотрофобласта, локалізованих у стінці спіральних артерій, інтенсифіковані процеси Вах-залежного апоптозу за відсутності протидії з боку протиапоптогичних протеїнів Vcl-2, Mcl-1, Vcl-XL, цитотрофобласт іншої локалізації не змінює своєї апоптогичної активності, децидуцити та лімфоїдні клітини не дають апоптогичної відповіді, в ендотеліоцитах спіральних артерій відмічається активізація Вах-залежного апоптозу за відсутності реакції з боку протеїнів Vcl-2, Mcl-1, Vcl-XL.

Ключові слова: залізодефіцитна анемія вагітних, матково-плацентарна ділянка, апоптоз.

В останні роки стрімко зросло зацікавлення науковців патологією матково-плацентарної ділянки (МПД) [1-2], що зумовлено не тільки усвідомленням значення адекватного кровопостачання інтервільозних просторів плаценти через спіральні артерії. Почали обґрунтовуватися мор-

фологічні та молекулярні механізми гестаційних перебудов спіральних артерій [3], в яких провідну роль відіграють такі клітини МПД як цитотрофобласт, децидуцити, імунні клітини, ендотеліоцити [4, 5]. Функція їх значною мірою залежить від перебігу в них процесів відмирання (апоптозу, некрозу). При активації молекулярних механізмів цих процесів вже на ранніх стадіях, коли ще немає помітних морфологічних змін, розвивається дисфункція мітохондрій, ендоплазматичного ретикулуму, ядер, ядерцець. Тоді, коли некроз викликається стимулами значної сили, апоптоз є процесом, який тонко регулюється генетично та з допомогою модифікуючих факторів, типовими зовнішніми представниками яких є помірна гіпоксія й інтенсифікація вільнорадикальних процесів [6, 7]. При залізодефіцитній анемії вагітних (ЗДАВ), яка супроводжується активацією вільнорадикальних процесів, процеси апоптозу в клітинах МПД не вивчені.

Мета дослідження. Встановити особливості апоптозу у цитотрофобласті, децидуцитах, лімфоїдних клітинах, ендотеліоцитах спіральних артерій МПД при залізодефіцитній анемії вагітних.

Матеріал і методи. Матеріал МПД отриманий під час кесаревих розтинів (37-40 тиж. вагітності) методом спеціальної біопсії та умов розташування плаценти [2]. Випадків із ЗДАВ (основна група) досліджено 12, без анемії (контрольна група) – 11.

Для вивчення експресії проапоптотичного антигену CD95 та антигенів-маркерів різних типів лімфоцитів CD1a, CD3, CD4, CD8-альфа, CD22 [8] (за допомогою відповідних антитіл та авідинбіотинової системи візуалізації ABC – DakoCytomation, Denmark-USA) використовували кріостатні зрізи тканини. Решта імуногістохімічних методик та оглядове гістологічне дослідження при забарвленні гематоксилином і еозином виконували на парафінових зрізах. Для ідентифікації клітин з характерними для апоптозу розривами ДНК використовували метод TUNEL [9] із застосуванням тест-системи TACS XL™ (R&D Systems, Inc., USA) з дозбарвленням клітинних ядер (ядерної ДНК) метиловим зеленим. Для імуногістохімічної ідентифікації проапоптотичних (протеїнів Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL) молекулярних факторів [10, 11] використали первинні антитіла до цих антигенів та стрептавідинбіотинову систему візуалізації LSAB2 (пероксидазна мітка + діамінобензидин) виробника DakoCytomation (Denmark-USA). Максимально дотримувалися стандартизації протоколу методики для всіх зрізів. Ядра дофарбовували гематоксилином Майєра. Для кількісних досліджень інтенсивності забарвлення спочатку отримували цифрові копії оптичного зображення

фрагментів МПД за допомогою об'єктива мікроскопа x70 (водна імерсія). Потім цифрові копії зображення аналізували за допомогою ліцензійної копії комп'ютерної програми "ВідеоТест – Розмер 5.0" (ООО Відеотест, РФ) – комп'ютерна денситометрія. Аналіз здійснювали на підставі замірів по всій площі зрізу цитоплазми кожної клітини за двома показниками: "Середня яскравість" (в одиницях яскравості), "Відхилення яскравості" (в одиницях яскравості) [10].

При статистичній обробці даних після процедури прийняття гіпотези про нормальність всіх вибірок за допомогою критерію Хана-Шаніро-Уїлкі вираховували середню арифметичну та її похибку, а потім вірогідність різниці між групами дослідження визначали за допомогою двостороннього непарного критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Різні типи неушкоджених клітин можна надійно ідентифікувати за їх характерною морфологією та локалізацією.

Стосовно розподілу цитотрофобласта по МПД у гістологічних та імуногістохімічних препаратах як при ЗДАВ, так і без анемії підтверджені загальні закономірності, притаманні процесам інвазії цих клітин [3, 4]. Зокрема, виявлено пул цитотрофобласта, який щойно залишив якірну хоріальну ворсинку і занурюється у МПД (рис. 1, А), окремі клітини цитотрофобласта у фібриноїді МПД (рис. 1, Б) або серед децидуцитів (рис. 2, В), пул цитотрофобласта, що інтенсивно проліферує, з компактним розташуванням клітин (рис. 1, Б), пул цитотрофобласта, який знаходиться у стінці спіральних артерій (рис. 1 – В, Г), неактивні в інвазивному плані дво- (рис. 2, А) та багатоядерні форми інтерстиційного цитотрофобласта. Названі форми цитотрофобласта CD95-негативні, що вказує на відсутність у них процесів рецепторозумовленого (через рецептор CD95) апоптозу. В той же час імуногістохімічно відмічалася чітка експресія проапоптотичного протеїну Вах, причому характер забарвлення мав комбінований характер – дифузно-гранулярний. Тлумачення такого забарвлення полягає в тому, що протеїн Вах може локалізуватися у цитозолі, мітохондріях та ендоплазматичному ретикулумі [11]. У цитозолі Вах знаходиться в мономерній формі, а в мембранах мітохондрій та ендоплазматичного ретикулума – у формі Вах-Вах гомодимеру або гомоолігомеру (до 8-10 молекул у комплексі) [11]. Вважається, що Вах-мономер є неактивною щодо апоптозу формою, тоді як Вах-Вах гомодимеру та гомоолігомери, вмонтовують

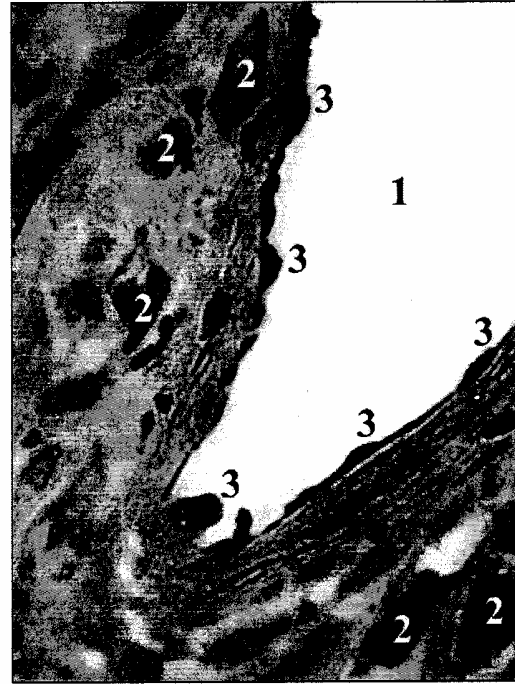
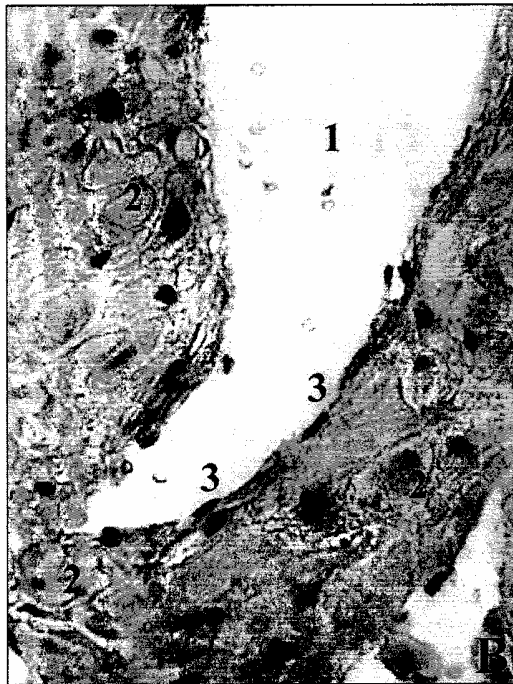


Рис. 1. Біопсії матково-плацентарної ділянки. Імуногістохімічна реакція з первинними антитілами до протеїну Вах, стрептавідинбіотинова система візуалізації LSAB2 з діамінобензидином, дозобарвлення ядер гематоксилином Майєра. $\times 400$

А – залізодефіцитна анемія вагітних: 1 – фрагмент якірної хоральної ворсини; 2 – група клітин цитотрофобласта. Б – залізодефіцитна анемія вагітних: 1 – ділянка фібриноїду з окремими клітинами цитотрофобласта; 2 – щільна група клітин проліферуючого цитотрофобласта. В – контрольна група: 1 – просвіт спіральної артерії; 2 – клітини цитотрофобласта; 3 – ендотелій спіральної артерії. Г – залізодефіцитна анемія вагітних: 1 – просвіт спіральної артерії; 2 – клітини цитотрофобласта; 3 – ендотелій спіральної артерії.

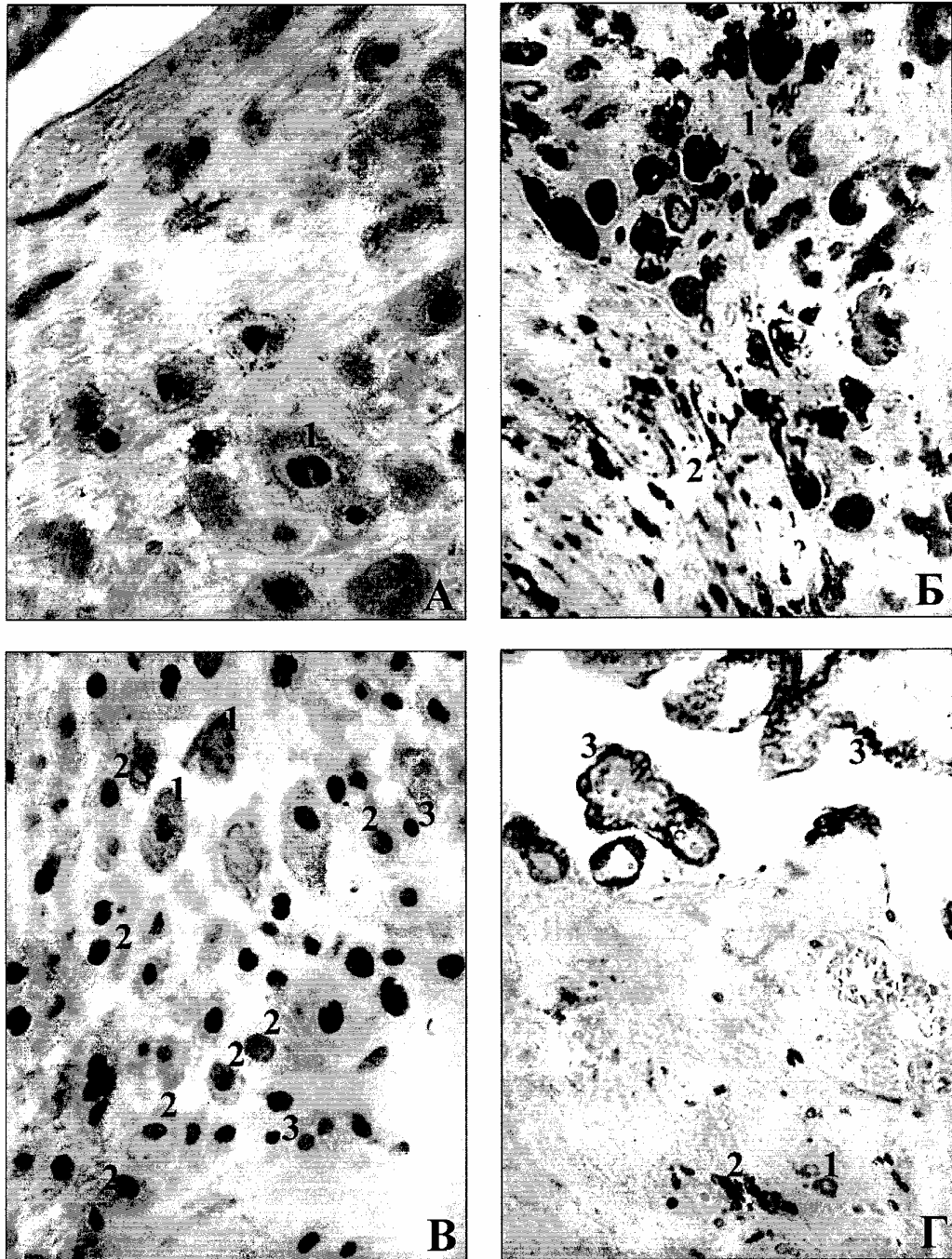


Рис. 2. Біопсії матково-плацентарної ділянки. Залізодефіцитна анемія вагітних. А,Б,В – імуногістохімічна реакція з первинними антитілами до протеїну Vax, стрептавідинбіотинова система візуалізації LSAB2 з діамінобензидином, дозобарвлення ядер гематоксиліном Майєра. х400. Г – імуногістохімічна реакція з первинними антитілами до протеїну Vcl-2, стрептавідинбіотинова система візуалізації LSAB2 з діамінобензидином, без дозобарвлення ядер. х80

А) 1 – двоядерний цитотрофобласт. Б) 1 – ділянка з дуже високою експресією протеїну Vax у цитотрофобласті; 2 – ділянка з апоптотичними тільцями. В) 1 – цитотрофобласт; 2 – децидуоцити; 3 – лімфоїдні клітини. Г) 1 – дві клітини цитотрофобласта; 2 – група лімфоїдних клітин; 3 – синцитіотрофобласт хоральної ворсини.

чись у мембрани (транслокація), генерують сигнали смерті, наприклад, через вивільнення з мітохондрій у цитозолі цитохрому С, який у свою чергу активує каспазний каскад [6, 11]. Означені варіанти внутрішньоклітинної локалізації протеїну Вах зумовлюють те, що в імуногістохімічних препаратах хромоген, який засвідчує позитивну реакцію на цей антиген і відображає його кількість, може розподілятися у вигляді дифузного забарвлення (Вах мономер у цитозолі) або ж у вигляді гранул (Вах-Вах гомодимер або гомоолігомер у мітохондріях та гранулярному ендоплазматичному ретикулумі). Отже, потрібно робити спроби оцінки просторового розподілу хромогену, використовуючи спеціальні кількісні показники, які дозволяють визначити співвідношення між активною та неактивною формами Вах. Таким був комп'ютерно-денситометричний показник "Відхилення яскравості" [10], який використовується додатково до іншого комп'ютерно-денситометричного показника "Середня яскравість". Для тлумачення останнього слід врахувати, що його більша величина відповідає меншому ступеню забарвлення.

Використання названих показників виявило певні закономірності залежно від пула цитотрофобласта. Пул цитотрофобласта, який щойно залишив якірну хоріальну ворсину і занурюється у МПД, пул цитотрофобласта, що інтенсивно проліферує з компактним розташуванням клітин, дво- та багатоядерні форми інтерстиційного цитотрофобласта характеризувалися близькими середніми параметрами розподілу протеїну Вах як при ЗДАВ, так і без анемії ($p > 0,05$). Зокрема, "Середня яскравість" в од. яскравості становила – $124 \pm 2,7$ (у контролі – $125 \pm 2,8$), $123 \pm 2,9$ ($123 \pm 3,4$), $125 \pm 2,1$ ($124 \pm 2,2$), а "Відхилення яскравості" в од. яскравості – $32 \pm 1,3$ ($33 \pm 1,8$), $34 \pm 1,9$ ($34 \pm 1,2$), $33 \pm 1,6$ ($35 \pm 2,4$) відповідно. Характерно, що в зазначених пулах цитотрофобласта навколо клітинного ядра майже не відмічалось гранулярного забарвлення (рис. 1, А-Б; рис. 2, А).

У клітинах цитотрофобласта, які окремо розташовані у фібриноїді МПД (рис. 1, Б) та серед децидуоцитів (рис. 2, В), гранулярне забарвлення поширювалося на всю цитоплазму клітин і в середньому більше ($p < 0,001$), ніж у попередньо охарактеризованих пулах клітин як за ступенем забарвлення, так і за ступенем гранулярності: "Середня яскравість" при ЗДАВ

становила – $108 \pm 1,7$ од. яскравості), "Відхилення яскравості" – $51 \pm 1,9$ од. яскравості ($53 \pm 1,9$ од. яскравості) – різниця між основною та контрольною групами невірогідна ($p > 0,05$). Наведені цифрові дані вказують на те, що в клітинах цитотрофобласта, які окремо розташовані у фібриноїді МПД (рис. 1, Б) та серед децидуоцитів активнішим є процес апоптозу, який реалізується через Вах-залежний механізм, ніж у пулі цитотрофобласта, який щойно залишив якірну хоріальну ворсину і занурюється у МПД, пулі цитотрофобласта, який інтенсивно проліферує з компактним розташуванням клітин, дво- та багатоядерних формах інтерстиційного цитотрофобласта.

Найпринциповіша з точки зору впливу ЗДАВ на МПД закономірність для цитотрофобласта стінок спіральних артерій. На підставі цифрових даних аналізу забарвлення при імуногістохімічному визначенні протеїну Вах ("Середня яскравість" – $204 \pm 1,1$ од., "Відхилення яскравості" – $4 \pm 0,3$ од. – тобто в описовому тлумаченні слабке майже гомогенне забарвлення), у контрольній групі у цих клітинах Вах-залежний механізм апоптозу не активований (рис. 1, В). При ЗДАВ отримані дані, що близькі до параметрів тих клітин цитотрофобласта, які окремо розташовані у фібриноїді МПД та серед децидуоцитів, а саме: "Середня яскравість" – $111 \pm 2,3$ од., "Відхилення яскравості" – $49 \pm 1,6$ од., що вірогідно відрізнялося ($p < 0,001$) від контролю (рис. 1, Г). Наведені дані вказують на те, що при ЗДАВ у клітинах цитотрофобласта стінки спіральних артерій інтенсифіковані процеси Вах-залежного апоптозу. Цей висновок дозволяє певною мірою пояснити недостатність гестаційних перебудов значної кількості спіральних артерій МПД при ЗДАВ.

Те, що висока експресія протеїну Вах і гранулярний характер його розподілу по цитоплазмі відповідає високій апоптотичній активності, підтверджується результатами аналізу імуногістохімічного забарвлення на протеїн Вах у місцях поблизу масового утворення апоптотичних тілець у МПД, де відмічалася найбільша інтенсивність та гранулярність забарвлення (рис. 2, Б), а також сильна прямопорційна кореляційна залежність ($r = 0,849$, $p < 0,001$) між гранулярністю цитоплазми цитотрофобласта та відсотком TUNEL-позитивних клітин даного типу.

При імуногістохімічному дослідженні проапоптотичного протеїну Bcl-XS не відмічено жодного випадку його експресії у цитотрофобласті МПД.

Дослідження протиапоптотичних протеїнів Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL у цитотрофобласті МПД показало експресію тільки протеїну Bcl-2, причому забарвлення виявлено лише в клітинах пула цитотрофобласта, який щойно залишив яєрну хоріальну ворсину і занурюється у МПД (рис. 2, Г) та в окремих клітинах пула інтенсивно проліферуючого цитотрофобласта з компактним розташуванням клітин. Згідно з комп'ютерно-денситометричним аналізом експресія протеїну Bcl-2 дуже слабка, причому не відрізнялася між групами дослідження. Наведені факти дозволяють вважати, що основним механізмом апоптозу цитотрофобласта у МПД є транслокація протеїну Вах з цитозолу в мітохондрії та ендоплазматичний ретикулум з наступною автоматичною активацією інших Вах-залежних молекулярних механізмів за відсутності протидії цьому протеїнів Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL.

У децидуїтах не виявлено експресії таких антигенів як CD95, Bcl-XS, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL, зареєстрована лише слабка експресія антигену Вах (однакова в обох групах дослідження), причому забарвлення носило переважно гомогенний характер (рис. 2, В). Такі результати дозволяють констатувати низький рівень апоптотичних процесів у децидуїтах, що підтверджується малою кількістю цих клітин з морфологічними ознаками апоптозу (маргіналія хроматину, відсутність ядерць, заокруглення форми клітин, кількість TUNEL-позитивних клітин).

У лімфоїдних клітинах МПД як при ЗДАВ, так і без анемії відмічалася слабка експресія проапоптотичних антигенів CD95 (на поверхні клітини) та Вах (гомогенний розподіл в цитоплазмі – рис. 2, В), але виражена експресія протиапоптотичного антигену Bcl-2 (рис. 2, Г). Вірогідної різниці у кількісних параметрах не виявлено. Інші протиапоптотичні протеїни (Mcl-1, Bcl-XL) не експресувалися. Отже, в лімфоїдних клітинах МПД при ЗДАВ апоптотичні процеси не активовані, що підтверджується відсутністю TUNEL-позитивних клітин.

Здійснена спроба виявити, в яких саме лімфоїдних клітинах відмічалася експресія тих молекул, які регулюють процеси апоптозу. Оскільки лімфоїдні клітини характеризуються порів-

няно малими розмірами (у препаратах вони за діаметром еквівалентні товщині одного гістологічного зрізу), то методика серійних зрізів з використанням імуногістохімічних реакцій на антигени-маркери не придатна для точної ідентифікації (зіставлення з експресією апоптоз-асоційованих молекул) певних типів лімфоїдних клітин. Довелося скористатися простим аналітичним порівнянням. Зокрема, за позитивною експресією CD22 серед лімфоїдних клітин встановлена присутність зрілих форм В-лімфоцитів (24-32 %), а за експресією антигену CD3 – периферійних Т-лімфоцитів (64-71 %). Т-лімфоцити кілери (CD8-альфа-позитивні клітини) та Т-лімфоцити хелпери (CD4-позитивні клітини) – приблизно в рівних співвідношеннях. Серед Т-лімфоцитів іноді визначалися активовані форми (CD1a-позитивні клітини). Кількісних відмінностей за розподілом лімфоїдних клітин по МПД між групами дослідження не виявлено.

Вивчення апоптоз-асоційованих протеїнів в ендотеліоцитах спіральних артерій МПД дозволило виявити чітку відмінність між групами дослідження за експресією протеїну Вах. Зокрема, при ЗДАВ показник "Середня яскравість" становив $73 \pm 2,1$ од., тоді коли в контролі – $185 \pm 2,4$ од. ($p < 0,001$), а показник "Відхилення яскравості" – $61 \pm 1,6$ та $7 \pm 0,4$ од. відповідно ($p < 0,001$). В ендотеліоцитах спіральних артерій МПД відмічалася помірна експресія протиапоптотичного протеїну Bcl-2, хоч різниці між основною і контрольною групами не знайдено. Слід зауважити, що повноцінно оцінити встановлені факти для ендотеліоцитів складно, адже апоптотичні тільки ендотеліального походження виявити неможливо, бо ендотелій після запуску апоптотичної програми швидко підлягає десквамації та виноситься з кров'ю [3]. Однак при ЗДАВ, на відміну від контролю, поодинокі ендотеліоцити спіральних артерій мали TUNEL-позитивні ядра, хоч необхідної статистичної вірогідності ($p \leq 0,05$) ця частота не досягла.

Висновки. 1. При залізодефіцитній анемії вагітних у клітинах цитотрофобласта стінки спіральних артерій матково-плацентарної ділянки інтенсифіковані процеси Вах-залежного апоптозу за відсутності протидії з боку протиапоптотичних протеїнів Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL. Цитотрофобласт іншої локалізації при анемії не змінює своєї апоптотичної активності. 2. Де-

цидуцити та лімфоїдні клітини матково-плацентарної ділянки не дають апоптотичної відповіді на залізодефіцитну анемію вагітних. 3. В ендотеліоцитах спіральних артерій матково-плацентарної ділянки при залізодефіцитній анемії вагітних відмічається активація Вах-залежного апоптозу за відсутності реакції з боку

протиапоптотичних протеїнів Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL.

Перспектива наукового пошуку полягає у кореляційному та регресійному аналізі зв'язків молекулярних механізмів апоптозу у цитотрофобласті, ендотеліоцитах спіральних артерій та їх гестаційних перебутов.

Література

1. Huisman M.A., Timmer A., Zeinstra M. Matrix-metalloproteinase activity in first trimester placental bed biopsies in further complicated and uncomplicated pregnancies // *Placenta*. – 2004. – V. 25. – P. 253-258.
2. Тюленева О.А., Заболоцький В.М. Морфологія кровоносних судин матково-плацентарної ділянки та біометрія при екстрахоріальних плацентах // *Бук.мед.вісник*. – 2004. – Т.8, № 3-4. – С. 229-232.
3. Benirschke K., Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. – 4th ed. – 2000. – New York: Springer, 974 p.
4. Милованов А.П., Кириченко А.К. Молекулярные механизмы регуляции цитотрофобластической инвазии в маточно-плацентарной области // *Арх. патол.* – 2001. – Т. 63, № 5. – С. 3-8.
5. Pongcharoen S., Bulmer J.N., Searle R.F. No evidence for apoptosis of decidual leucocytes in normal and molar pregnancy: implications for immune privilege // *Clin. Exp. Immunolog.* – 2004. – V. 138. – P. 330-336.
6. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta // *Histochem. Cell Biol.* – 2004. – V. 122. – P. 369-382.
7. Trichopoulos D. Short-term and long term effects of iron deficiency in utero // *The Lancet*. – 2000. – V. 356. – P. 696.
8. Классификация антигенов лейкоцитов человека (система CD) / Глузман Д.Ф., Склярченко Л.М., Надгорная В.А. и др. – К.: ИЭПОР, 2003. – 40 с.
9. Бондаренко Г.І., Задорожна Т.Д., Аракова Т.М. та ін. Порівняльна характеристика методів виявлення апоптозу в плаценті // *Вісн. морфології*. – 2002. – № 1. – С. 43-46.
10. Давиденко І.С. Імуногістохімічний розподіл протеїнів Вах та Bcl-2 у клітинах Гофбауера плаценти при залізодефіцитній анемії вагітних // *Бук. мед. вісник*. – 2005. – Т. 9, № 3. – С. 88-91.
11. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins // *J. Cell. Mol. Med.* – 2003. – V. 7, N. 3. – P. 249-257.

АПОПТОЗ В КЛЕТКАХ МАТОЧНО-ПЛАЦЕНТАРНОЙ ОБЛАСТИ ПРИ ЖЕЛЕЗОДЕФИЦИТНОЙ АНЕМИИ БЕРЕМЕННЫХ

И.С.Давыденко, В.П.Пишак, М.Ю.Коломоец, И.Й.Сидорчук, О.В.Пишак, И.Ф.Курченко

Резюме. Иммуногистохимическими (метод TUNEL, определение антигенов Вах, Bcl-XS, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL, CD1a, CD3, CD4, CD8a, CD22, CD95) и гистологическими методами исследованы процессы апоптоза в клетках маточно-плацентарной области при железодефицитной анемии беременных. В клетках цитотрофобласта, локализованных в стенке спиральных артерий, интенсифицированы процессы Вах-зависимого апоптоза при отсутствии противодействия со стороны антиапоптотических протеинов Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL, цитотрофобласт иной локализации не меняет своей апоптотической активности, децидуциты и лимфоидные клетки не дают апоптотического ответа, в эндотелиоцитах спиральных артерий отмечается активизация Вах-зависимого апоптоза при отсутствии реакции со стороны протеинов Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL.

Ключевые слова: железодефицитная анемия беременных, маточно-плацентарная область, апоптоз.

APOPTOSIS IN CELLS OF THE UTERO-PLACENTAL REGION IN IRON-DEFICIENCY ANEMIA OF GRAVIDAS

I.S.Davydenko, V.P.Pishak, M.Yu.Kolomoiets, I.Y.Sydorchuk, O.V.Pishak, I.F.Kurtchenko

Abstract. By means of immunohistochemical (the TUNEL method of determining antigens Вах, Bcl-XS, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL, CD1a, CD3, CD4, CD8a, CD22, CD95) and histological methods the processes of apoptosis are studied in cells of the utero-placental region in iron-deficiency anemia of gravidas. The processes of Вах-dependent apoptosis in case of the absence of a counteraction on the part of antiapoptotic proteins Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL are intensified, a cytotrophoblast of diverse localization does not change its apoptotic activity, decidualocytes and lymphoid cells do not give apoptotic response in the cells of a cytotrophoblast localized in the wall of the spiral arteries, an activation of Вах-dependent apoptosis is noted in case of the absence of reaction on the part of proteins Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL.

Key words: iron-deficiency anemia of gravidas, utero-placental region, apoptosis.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Надійшла в редакцію 17.10.2005 р.