

## НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАДИОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМА И ИХ КОРРЕКЦИЯ

В работе показано, что внешнее пролонгированное  $\gamma$ -излучение низкой мощности вызывает незначительную лейкопению у лабораторных животных. Однократное воздействие внешней радиации в ЛД<sub>50/30</sub> резко угнетает показатели кроветворной, иммунной и антиоксидантной систем организма. Применение биологических препаратов в качестве адаптогенов способствует коррекции гемопоэза, клеточного звена иммунитета и антиокислительных процессов у летально облученных крыс.

В радиобиологических исследованиях особый интерес вызывает степень радиочувствительности живых организмов и возможность ее коррекции. Известно, что в развитии и исходе радиационного поражения ведущая роль принадлежит так называемым критическим системам [1]. Основным звеном патогенеза радиационного поражения критических систем является комплекс структурно-метаболических нарушений в клетке, приводящих к нарушению ее функции или гибели. В этом отношении кроветворные клетки и клетки периферической крови являются наиболее радиочувствительными. Ко всему этому воздействие ионизирующих излучений вызывает в организме каскад патологических реакций, результатом которых является формирование вторичного иммунодефицита панцитопенического типа. При этом в процесс поражения вовлекаются практически все звенья системы и репарация поврежденных замедляется.

В экспериментальных условиях на крысах проведены опыты по изучению длительного влияния низких уровней радиации на гематологические показатели и влияния летальных доз радиации на некоторые показатели иммунитета, гемопоэза и антиоксидантной системы на фоне применения флоренты и эраконда.

*1. Влияние низких уровней радиации на гематологические показатели.* Изменения в картине крови при воздействии однократного облучения в летальных дозах довольно хорошо изучены [2]. Что касается воздействия низких уровней радиации на кровь и на организм в целом в течение продолжительного времени, то этот вопрос до сих пор требует дополнительного изучения.

Учитывая вышеизложенное, в задачу наших исследований на данном этапе входило изучение клинико-гематологических показателей животных в условиях хронического воздействия гамма-излучения низкой мощности.

Опыты проведены на белых нелинейных крысах с массой тела 120 г к началу эксперимента. Для моделирования воздействия радиационных факторов при хроническом облучении использовали гамма-облучение изотопных источников цезия-137. Выбор способа облучения и конструкции установок для длительного облучения животных производили, исходя из существующих к подобному роду экспериментов требований.

Для выполнения этих требований наиболее оптимальным вариантом явилось использование гамма-установки биологической экспериментальной ГУБ-20. Все требования, предъявляемые к постановке данного опыта, были соблюдены. Животных облучали дозой при мощности 0,39 мГр/час в течение 30, 60, 90 и 120 дней. При этом суммарная доза составила соответственно 0,28; 0,56; 0,84 и 1,20 Гр. Содержание и кормление крыс было однотипным. Наблюдение за общим состоянием животных велось в течение всего эксперимента.

В результате исследований установлено, что крысы, находившиеся под непрерывным облучением в течение 30, 60, 90 и 120 суток, клинически выглядели здоровыми, адекватно реагировали на внешние раздражители, охотно поедали корм. Однако следует отметить, что такие особенности были характерны для второго, третьего и четвертого месяцев нахождения животных под облучением. Несколько хуже они чувствовали себя в течение первого месяца, находясь в условиях непрерывного воздействия гамма-излучения низкой интенсивности. Вероятно, спустя месяц крысы смогли выработать адаптационные реакции и приспособиться к условиям воздействия физического фактора, коим явилось воздействие внешней радиации. Гибели животных в течение эксперимента, как в опытных группах, так и в группах биологического контроля, не отмечалось.

В картине периферической крови общее количество лейкоцитов во всех группах подопытных животных имело тенденцию к снижению. Так через 30 дней пребывания в области непрерывного  $\gamma$ -воздействия количество лейкоцитов находилось в пределах  $5,82 \pm 0,35 \cdot 10^9/\text{л}$ , что составляло 68,4% по отношению к биологическому контролю. Уменьшение данного показателя у подопытных крыс носило достоверный характер.

Спустя два месяца, несмотря на улучшение общего состояния, этот показатель находился в пределах  $4,20 \pm 0,17 \cdot 10^9/\text{л}$ , что достоверно ниже показателя группы биологического контроля на 50,6%. Через 90 дней наблюдалась тенденция лейкоцитов к восстановлению, но, тем не менее, примерно на 40% их число оставалось ниже таковых своих интактных аналогов. По истечении 120 дней (4 месяца) динамика роста общего числа лейкоцитов сохранялась, и их количество достигало  $6,07 \pm 0,20 \cdot 10^9/\text{л}$  при  $8,50 \pm 0,34 \cdot 10^9/\text{л}$  в биологическом контроле.

Гранулоциты в суммарном количественном отношении, в свою очередь, имели тенденцию к увеличению по сравнению с биологическим контролем. Такая особенность была характерна для 1, 2 и 3 групп, соответственно спустя 30, 60 и 90 суток после облучения, со сдвигом ядра влево. Исключение составила группа крыс, находившаяся под облучением 120 суток. В этой группе к концу данного срока содержание лейкоцитов находилось в пределах биологического контроля. В картине красной крови заметных изменений не отмечалось, это свидетельствует об относительной радиорезистентности эритроцитов. Гемоглобин у животных всех подопытных групп находился в пределах

физиологической нормы или в пределах нижней границы физиологической нормы (облучение в течение 30 суток).

Таким образом, при нахождении крыс под непрерывным воздействием радиации низкой мощности в течение 4 месяцев заметные изменения происходят в картине белой крови, характеризующиеся лейкопенией, за счет снижения лимфоцитов. Картина красной крови остается без изменений.

2. *Влияние флоренты на некоторые показатели иммунитета у облученных крыс.* Изыскание средств повышения резистентности организма к воздействию ионизирующей радиации всегда вызывало и вызывает определенный интерес. В этом плане заслуживают внимания препараты природного происхождения, поскольку они наиболее доступны и не токсичны. Нами для исследования был взят фитопрепарат под названием «флорента». Он представляет собой экстракт пихты сибирской, изготовленный фирмой «Биолит» (г. Томск). Этот препарат известен в народной медицине. Его применяют для повышения общей сопротивляемости организма к неблагоприятным факторам [3].

В организме животных и человека иммунной системе отводится важная регуляторная роль, подобно нервной и эндокринной. Известно, что ионизирующие излучения в средние летальных дозах и выше являются сильными депрессантами. При этом отдельные клетки иммунной системы продолжают выполнять присущие им функции, но нарушаются процессы их кооперации, в результате чего может наблюдаться изменение соотношения различных субпопуляций клеток, изменение биологически активных веществ и, как следствие, нарушение функций иммунной системы [4].

Таблица 1. Лейкоцитарная формула подопытных крыс

Показатели	Группы				
	1	2	3	4	5 (б.к.)
Лейкоциты ( $\text{п} \cdot 10^9/\text{л}$ )	$5,82 \pm 0,35$	$4,20 \pm 0,70$	$5,06 \pm 0,75$	$6,07 \pm 0,20$	$8,50 \pm 0,34$
Эозинофилы (%)	$1,6 \pm 0,3$	–	–	–	$1,6 \pm 0,39$
Юные (%)	–	$0,8 \pm 0,12$	$0,2 \pm 0,17$	$0,48 \pm 0,02$	$0,50 \pm 0,02$
Палочки (%)	$2,4 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,81$	$2,2 \pm 0,17$	$1,3 \pm 0,8$	$2,0 \pm 0,07$
Сегменты (%)	$22,0 \pm 1,9$	$15,3 \pm 1,2$	$24,0 \pm 4,7$	$14,3 \pm 1,1$	$14,6 \pm 1,2$
Моноциты (%)	–	$0,30 \pm 0,08$	–	–	$1,40 \pm 0,24$
Лимфоциты (%)	$74,0 \pm 2,1$	$76,0 \pm 1,3$	$73,2 \pm 4,9$	$82,6 \pm 0,6$	$83,6 \pm 1,5$

Учитывая вышеизложенное, мы сочли необходимым изучить влияние радиации на некоторые показатели иммунитета у животных на фоне применения флоренты. Такими показателями явились Т- и В-лимфоциты.

Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 180-210 г. Животные были разделены на три группы: биологический контроль; облученный контроль; флорента+облучение. Однократное облучение животных в дозе 7 Гр проводили на  $\gamma$ -установке «Агат-С» при мощности дозы 6 Гр/мин с источником излучения  $^{60}\text{Co}$ . Исследуемый препарат крысы принимали ежедневно в течение недели до облучения (3 группа) в объеме 2,5 мл концентрированного раствора с водой вволю. Содержание Т- и В-лимфоцитов в периферической крови определяли через 24 часа и 7 суток методами Е-РОК и ЕАС-РОК. Кровь для исследования брали из яремной вены при убое животных декапитацией под эфирным наркозом. Выбранные сроки исследования отражают первичную реакцию на облучение и разгар болезни соответственно.

Результаты исследований показали, что в периферической крови здоровых крыс (группа биологического контроля) находится  $45,5 \pm 3,8\%$  Т-лимфоцитов и  $19,0 \pm 1,6\%$  В-лимфоцитов. Известно, что Т-лимфоциты являются клеточным звеном иммунитета, а В-лимфоциты – гуморальным звеном. Через сутки после облучения в дозе 7 Гр увеличивается число В-лимфоцитов. Увеличение В-лимфоцитов, примерно на 20%, при воздействии указанной дозы, вероятно, происходит в результате стимуляции их «лучевыми» антигенами, т.е. модифицированными молекулярными субстанциями, которые возникают спустя некоторое время после воздействия радиации на организм в летальных дозах [5, 6]. В-лимфоциты способствуют размножению плазматических клеток, продуцирующих антитела к названным антигенам. Содержание Т-лимфоцитов в этот период лучевой болезни остается в пределах физиологической нормы. В разгар болезни (7 суток) содержание Т-лимфоцитов резко снижается на 50% по отношению к биологическому контролю, а В-лимфоциты в этот период находятся выше пределов физиологической нормы (рис. 1, 2).

Применение флоренты до облучения в указанных дозовых концентрациях и временных

диапазонах способствует коррекции содержания Т- и В-лимфоцитов и их соотношения в период первичной реакции на облучение и разгар болезни (рис. 1, 2). Так количество В-лимфоцитов через 24 часа после воздействия  $\gamma$ -квантов повышается, но процент этого повышения отстает от животных облученного контроля наполовину. Следовательно, можно предположить, что в облученном организме на фоне применения флоренты в значительно меньшем количестве образуются модифицированные молекулярные субстанции, стимулирующие гуморальное звено иммунитета, а в конечном итоге вызывающие иммунодефицитные состояния и приводящие организм, как известно, к лучевой патологии [6]. В разгар болезни (7 суток) на фоне применения флоренты динамика снижения Т-лимфоцитов существует, но в отличие от облученного контроля не на 50%, а только на 20% (рис. 2).

Таким образом, применение флоренты в течение недели до облучения, вероятно, купирует образование свободных радикалов и накопление перекисных соединений, вызывающих модификацию молекулярных субстанций клеток, и тем самым способствует кор-

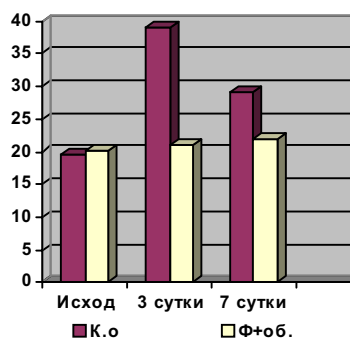


Рисунок 1. Содержание В-лимфоцитов в периферической крови облученных крыс на фоне применения флоренты

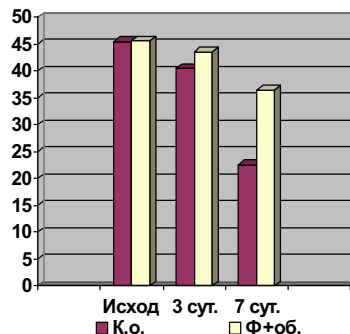


Рисунок 2. Содержание Т-лимфоцитов в периферической крови облученных крыс на фоне применения флоренты

рекции взаимоотношений между Т- и В-лимфоцитами, а следовательно, между клеточным и гуморальным фактором иммунитета у животных, подвергнутых общему тотальному внешнему воздействию радиации.

3. *Влияние эраконда на гемопоэз у облученных крыс.* Костный мозг, будучи основным источником регенерации клеток периферической крови, относится к первой группе критических органов у облученных ионизирующим излучением животных. Поскольку биологическая сущность острого лучевого повреждения заключается в угнетении процессов клеточного обновления, степень радиационного поражения и темпы восстановления кроветворной ткани и обуславливают шансы на выживание организма [7]. Коррекция гемопоэза у облученных животных является одной из основополагающих задач современной радиобиологии. Работы в этом направлении проводятся постоянно и в связи с этим известны разные фармакохимические и биологические средства, обладающие радиозащитным эффектом при костномозговой форме острой лучевой болезни у лабораторных животных [7, 8, 9, 10, 11, 12]. На данном этапе работы мы поставили перед собой цель – изучить влияние эраконда на некоторые показатели гемопоэза у крыс, подвергнутых воздействию  $\gamma$ -излучения.

Эраконд представляет собой экстракт люцерны посевной (*Medicago sativa*), полученный при гидробарометрической обработке наземной части растения с добавлением определенного набора микроэлементов. Препарат разработан в НВП «АПТ-Экология» (Екатеринбург).

Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 180-210 г. Животные по принципу аналогов были разделены на 3 группы: интактные (1); облученный контроль (2); эраконд+облучение (3). Крыс подвергали однократному воздействию  $\gamma$ -излучения в дозе 7 Грей (Гр) на  $\gamma$ -установке «Агат-С» при мощности дозы 0,6 Гр/мин с источником излучения  $^{60}\text{Co}$ . В течение 5-10 дней до облучения крысам третьей группы вводили 10% раствор фитопрепарата эраконд с водой или кормом в дозе 5,0-7,5 мл/кг.

Животных умерщвляли под эфирным наркозом. Исследовали общее количество клеток в костном мозге бедренной кости [13]. На мазках-отпечатках костного мозга под-

считывали процентное содержание отдельных миелокариоцитов [13]. Клеточный состав периферической крови изучали общепринятыми методами. Полученный цифровой материал обрабатывали методом вариационной статистики. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

В результате исследований установлено, что облучение в дозе 7,0 Гр вызывает клеточное опустошение костного мозга крыс уже в первые часы после облучения, достигая минимальных значений ко вторым суткам. Так общее количество клеток в костном мозге через 48 часов после воздействия радиации уменьшалось на 85% и составляло лишь 15% от исходного уровня. Начиная с третьих суток происходило постепенное восстановление гемопоэза. На 8-й день общее количество клеток в костном мозге достигало уже 60-80% по отношению к биологическому контролю.

Заметное уменьшение клеток костного мозга в период первичной реакции на облучение, как и любой активно пролиферирующей системы клеточного обновления, укладывается в известную схему митотической гибели клеток: задержка вступления в митоз; образование нежизнеспособных гигантских клеток; гибель после первого деления; гибель в последующих делениях. Возможные причины задержки клеточного деления обусловлены разрушением веществ, стимулирующих митоз; нарушением проницаемости клеточных мембран; нарушением синтеза нуклеиновых кислот; структурными повреждениями хромосом. Многие авторы считают [1, 7, 8], что массовая гибель клеток костного мозга в ранние сроки (10–12 ч после облучения) является интерфазной, т. е. наступающей до следующего деления. В патоморфологическом плане интерфазная гибель миелокариоцитов проявляется как общий «некроз» костного мозга. Признаки интерфазной гибели наиболее отчетливо прослеживаются в патологии ядерных структур клеток: пикнозе (гомогенизации) ядерного материала, распаде хроматина, фрагментации клеток с образованием так называемых апоптозных телец. Частота клеток костного мозга с пикнотическими ядрами в раннем постлучевом периоде зависит от дозы облучения.

Картина периферической крови крыс в период первичной реакции на облучение характеризовалась глубокой лейкопенией (ко-

личество лейкоцитов составляло  $1,6 \cdot 10^9/\text{л}$ ). Существенное снижение общего числа лейкоцитов было обусловлено выраженной лимфопенией. Количество эритроцитов на этот период снижалось до  $3,1 \pm 0,05 \cdot 10^9/\text{л}$ , а тромбоцитов – до  $414 \pm 9 \cdot 10^9/\text{л}$ . На 8-е сутки после облучения у животных данной группы наблюдалась более выраженная лимфопения, эритропения, тромбоцитопения. Показатели, полученные при воздействии внешнего облучения в дозе 6,0 Гр в наших исследованиях, являлись контролем для 3 группы опытных животных, которые получали эраконд до облучения летальной дозой.

Влияние эраконда на состояние гемопоэза у облученных животных было очевидным. Так в группе животных, которым до воздействия  $\gamma$ -излучения вводили эраконд, общее число клеток костного мозга в период первичной реакции на облучение превосходило этот показатель группы облученного контроля на 30-40%. Эта закономерность была характерна и для показателей периферической крови – лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, в аналогичных процентных соотношениях. Можно предположить, что эраконд купирует накопление радиотоксинов, вызывающих митотическую и интерфазную гибель клеток в костном мозге облученных животных, обладает способностью защищать вещества, стимулирующие митоз, предотвращать нарушение проницаемости клеточных мембран и нарушение синтеза нуклеиновых кислот.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о радиозащитных свойствах эраконда, которые проявляются в коррекции гемопоэза у крыс, подвергнутых воздействию  $\gamma$ -излучения в дозе 7,0 Гр.

4. *Влияние эраконда на показатели антиоксидантной системы.* Для обоснования данной серии опытов учитывали механизм первичного биологического действия ионизирующих излучений, который включает в себя цепочку физических, физико-химических, биохимических процессов, которые обуславливают дальнейшее развитие патологических процессов в организме. Известно, что в скоротечном периоде первичной реакции на облучение в организме формируются реакции свободно-радикального типа, которые влекут за собой образование перекисных соединений,

обладающих выраженными окислительными свойствами. Поэтому при разработке методов терапии и профилактики острого лучевого поражения очень важно обращать внимание на средства, механизм действия которых направлен на снятие перечисленных процессов, возникающих в организме в первые минуты и часы после облучения. В настоящее время для повышения резистентности организма широко применяются так называемые адаптогены. К ним относят зоопрепараты, фитопрепараты, многокомпонентные смеси, иммуномодуляторы. Общим свойством адаптогенов является их способность стимулировать возрастание уровня эндогенного фона радиорезистентности [14, 15]; активировать антиокислительные, а также и репаративные процессы систем, мобилизовать противолучевые и общебиологические защитные ресурсы организма [14, 15]. Среди них особый интерес вызывают фитопрепараты природного происхождения, поскольку они более доступны, как правило, не токсичны, а потому их применение не вызывает побочных эффектов. Доказательством тому является успешное применение препаратов женьшеня, элеутерококка, китайского лимонника для повышения как общей резистентности, так и радиорезистентности организма [16, 17].

Задачей наших исследований явилось изучение антиоксидантных свойств эраконда в эксперименте на облученных животных.

Опыты проведены на белых беспородных крысах-самцах с массой тела 180-210 г. Животные по принципу аналогов были разделены на три группы: интактные (1); облученный контроль (2); эраконд+облучение (3). Крыс подвергали однократному воздействию  $\gamma$ -излучения в дозе 7 Грей (Гр) на  $\gamma$ -установке «Агат-С» при мощности дозы 0,6 Гр/мин с источником излучения  $^{60}\text{Co}$ . В течение 5-10 дней до облучения крысам третьей группы вводили 10% раствор фитопрепарата эраконд с водой или кормом в дозе 5,0-7,5 мл/кг.

Интенсивность перекисного окисления липидов по накоплению малонового диальдегида (МДА) и состояние антиоксидантной системы по активности глутатионредуктазы (ГР) в печени крыс определяли общепринятыми методами [18]. Убой животных для исследования проводили через 24 часа и 7 суток после облучения. Эти сроки соответ-

ственно характеризуют первичную реакцию на облучение и разгар болезни.

Результаты исследований показали, что в период первичной реакции на облучение (1-е сутки) в печени крыс происходит накопление МДА с дальнейшей тенденцией к увеличению в разгар болезни (7-е сутки). Сравнительный анализ показал, что концентрация МДА у облученных животных превосходила таковой показатель интактных аналогов, в среднем на 30-40%. Одновременно с этим ослабевала антиоксидантная система, которая характеризовалась одним из компонентов антиоксидантной защиты организма – глутатионредуктазой. Так активность ГР понижалась на 20-25% (1-е сутки) и 27-30% (7-е сутки).

Применение эраконда в качестве радиозащитного средства показало, что данный препарат в этом плане заслуживает внимания. Накопление МДА в печени крыс, получавших эраконд в течение недели до воздействия  $\gamma$ -излучения в дозе 7 Гр, было достоверно ниже по сравнению с животными группы облученного контроля. Такая особенность прослеживалась как в период первичной реакции на облучение, так и в разгар болезни. Компонент антиоксидантной защиты организма – глутатионредуктаза в этой группе животных име-

ла значения, приближенные к таковым интактных животных.

Таким образом, эраконд обладает способностью защищать антиоксидантную систему облученных животных как радиопротектор. Ко всему этому следует добавить, что животные, подвергнутые воздействию внешней радиации, являются удобной экспериментальной моделью для определения антиоксидантных свойств различных фармакологических препаратов, применяемых в медицине.

*Заключение.* Внешнее пролонгированное  $\gamma$ -излучение низкой мощности вызывает незначительную лейкопению, которая регистрируется спустя 30, 60 и 90 суток после нахождения животных под непрерывным облучением. Картина красной крови спустя 120 суток нахождения под непрерывным облучением не изменяется, что свидетельствует о признаках адаптации со стороны кроветворной системы организма в ответ на воздействие низких уровней радиации в течение длительного времени.

Применение препаратов природного происхождения в качестве адаптогенов способствует коррекции гемопоэза, клеточного звена иммунитета и антиоксидантной системы у крыс, подвергнутых внешнему воздействию радиации в дозах, вызывающих среднюю степень лучевой патологии.

#### Список использованной литературы:

1. Кудряшов Ю.Б. Лучевое поражение «критических систем» // Лучевое поражение (острое лучевое поражение, полученное в эксперименте). М.: Изд-во МГУ, 1987. С. 5-73.
2. Груздев Г.П. Проблема поражения кроветворной ткани при острой лучевой патологии. –М.; Медицина, 1968. 212 с.
3. Гулик Е.С., Костеша Н.Я. Противолучевая активность хитозана в водном экстракте пихты сибирской // Радиационная биология. Радиоэкология. -2004, том 44, №5. –С. 563.
4. Сафонова В.Ю., Сафонова В.А. Радиационная экология. Оренбург, изд. центр ОГАУ. С. 238-247.
5. Сафонова В.А. К вопросу о роли иммунной системы в реализации лучевых реакций у животных // Сб.научных работ «Морфология и хирургия в практической ветеринарии и медицине. Оренбург, 1999. С. 150-152.
6. Клемпарская Н.Н., Иванов А.А., Мальцев В.Н. Аутоантитела облученного организма. М.: Атомиздат. 1972. 279 с.
7. Груздев Г.П. Проблема поражения кроветворной ткани при острой лучевой патологии. –М.; Медицина, 1968. 212 с.
8. Бутомо Н.В., Джаракьян Т.К., с соавт. Геморрагический синдром острой лучевой болезни. –Л.: Медицина, 1976. -168 с.
9. Андрущенко В.Н., Иванов А.А., Мальцев В.Н. Противолучевое действие веществ микробного происхождения // Радиационная биология. Радиоэкология. Т. 37, в.1,1997. С. 150-151.
10. Владимиров В.Г., Красильников И.И., Арапов О.В. Радиопротекторы – структура и функции. – Киев: Наук. думка. -1989. -259 с.
11. Гончаренко Е.Н., Кудряшов Ю.Б. Химическая защита от лучевого поражения. М.: Изд-во МГУ, 1985. 248 с.
12. Зяблицкий В.М., Семина О.В. Иммуномодулятор неоген стимулирует пострадиационное восстановление тромбоцитопоэза // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003.–Т. 43, №1. –С. 49-50.
13. Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. М.: Медицина, 1983. 240 с.
14. Гончаренко Е.Н., Кудряшов Ю.Б. Гипотеза эндогенного фона радиорезистентности. М.: Изд-во МГУ, 1980, 176 с.
15. Кудряшов Ю.Б. // Поиск и изучение механизмов действия новых природных и синтетических противолучевых средств. Москва-Пермь: Изд-во МГУ, ПГУ, 1989. С. 6-21.
16. Брехман И.И. Женьшень. Л.: Медгиз, 1957. 182 с.
17. Брехман И.И. Элеутерококк. Л.: Наука, 1968. 185 с.
18. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. 134 с.

Статья рекомендована к публикации 14.02.08