

О РОЛИ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ГОНАДНОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОПУХОЛЕВОЙ ПРОГРЕССИИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н. П. Чеснокова — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, профессор кафедры патологической физиологии, профессор, доктор медицинских наук; **В. Ю. Барсуков** — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, профессор кафедры факультетской хирургии и онкологии, профессор, доктор медицинских наук; **О. А. Злобнова** — ГБОУ ВПО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России, аспирант кафедры патологической физиологии.

ROLE OF FUNCTIONAL ACTIVITY ABNORMALITIES OF HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL SYSTEM IN PATHOGENESIS OF NEOPLASTIC PROLIFERATION IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

N. P. Chesnokova — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Pathological Physiology, Professor, Doctor of Medical Science; **V. Yu. Barsukov** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Faculty Surgery and Oncology, Professor, Doctor of Medical Science; **O. A. Zlobnova** — Saratov State Medical University n.a. V. I. Razumovsky, Department of Pathological Physiology, Post-graduate.

Дата поступления — 03.09.12 г.

Дата принятия в печать — 29.11.2012 г.

Чеснокова Н. П., Барсуков В. Ю., Злобнова О. А. О роли нарушений функциональной активности гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы в патогенезе опухолевой прогрессии при раке молочной железы // Саратовский научно-медицинский журнал. 2012. Т. 8, № 4. С. 915–919.

Цель: установить патогенетическую взаимосвязь между динамическими изменениями содержания в крови больших раком молочной железы отдельных фракций эстрогенов, прогестерона, фолликулостимулирующего, лютеинизирующего и соматотропного гормонов со стадией распространения неоплазии. **Материал и методы.** В работе проведена сравнительная оценка функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы 128 пациентов с инфильтративно-протоковой формой рака молочной железы (клинически узловатая форма патологии). Исследование гормонального статуса осуществлено с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа. **Результаты.** Изучение гормонального профиля периферической крови пациентов позволило обнаружить сохранность центрогенных гормональных влияний на периферические железы, обеспечиваемых такими гормонами гипоталамо-гипофизарной системы, как фолликулостимулирующий и лютеинизирующий гормоны. В то же время развитие начальных стадий опухолевой прогрессии при раке молочной железы закономерно сочетается с нарастанием уровня эстрадиола в крови, снижением содержания прогестерона и эстриола, обнаруживающих параллелизм со стадией опухолевого процесса. Гормональный дисбаланс характеризуется также увеличением содержания соматотропного гормона в крови больных раком молочной железы, прогрессирующим по мере метастазирования опухолевых клеток. **Заключение.** Ведущая роль в патогенезе рака молочной железы в различных возрастных группах больных принадлежит развитию гормонального дисбаланса. При этом нарушается принцип «обратной связи» между центральными гормональными влияниями и уровнем содержания в крови гормонов периферических желез.

Ключевые слова: рак молочной железы, гормональный дисбаланс.

Chesnokova N. P., Barsukov V. Yu., Zlobnova O. A. Role of functional activity abnormalities of hypothalamic-pituitary-gonadal system in pathogenesis of neoplastic proliferation in patients with breast cancer // Saratov Journal of Medical Scientific Research. 2012. Vol. 8, № 4. P. 915–919.

The research goal is to determine the pathogenic relationship between the dynamic changes of content of individual fractions of estrogen, progesterone, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and somatotrophic hormone in blood of patients with breast cancer from the stage of neoplasia spread. **Methods:** The authors have performed comparative evaluation of functional state of hypothalamic — pituitary — gonadal system in 128 patients with infiltrating ductal breast carcinoma (clinically nodular pathology form) using enzyme-linked immunosorbent analysis. **Results:** Examination of hormone profile of peripheral blood of patients with nodular breast cancer has revealed presence of centrogenous hormone influence on peripheral glands supplied by hormones of hypothalamic — pituitary system such as follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, these patients being of reproductive, climacteric and postmenopausal ages. At the same time, progress of initial stages of neoplastic proliferation in patients with breast cancer has been naturally accompanied by increase of estradiol level in blood, decrease of progesterone and estril levels in blood. These levels have been parallel to the stage of neoplastic process. Hormone disbalance has been also characterized by increase of somatotrophic hormone level in blood of patients with breast cancer. Hormone level increasing has been progressed by metastasizing neoplastic cells. **Conclusion:** The leading role in the pathogenesis of breast cancer in patients of different age groups should be assigned to the development of hormone disbalance. It should be noted that the principle of «feedback» between the central hormone influences and blood levels of hormones of peripheral glands has not been determined.

Key words: breast cancer, hormone disbalance

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) — одно из самых распространенных онкологических заболеваний среди женщин в России и за рубежом; на долю указанной патологии приходится около 20% в структуре онкологической заболеваемости женщин [1].

В настоящее время одной из ведущих концепций патогенеза РМЖ является точка зрения относительно «усиленной гормональной стимуляции» клетками, подвергающихся малигнизации [2].

Роль нарушений гормонального баланса в патогенезе РМЖ, как правило, коррелирует с наличием других факторов риска развития заболевания, включающих состояние репродуктивной системы организма, эндокрино-метаболические расстройства, генетические факторы (наличие протоонкогенов BRCA1 и BRCA2), а также действие канцерогенов экзогенной и эндогенной природы [3–5].

Что касается роли нарушений гормонального баланса в патогенезе неоплазий, то в определенный возрастной период гиперпродукция ряда гормонов может являться не только фактором риска, но и ведущим патогенетическим фактором развития РМЖ [3, 6].

До настоящего момента остаются в значительной мере не изученными системные паранеопластические расстройства, в том числе характер нарушений гормонального баланса, формирующихся в динамике распространения опухолевого процесса при РМЖ и в значительной мере определяющих тяжесть клинических проявлений патологии, эффективность терапии и прогноз заболевания.

Цель исследования: установить патогенетическую взаимосвязь между динамическими изменениями содержания в крови больных РМЖ отдельных фракций эстрогенов, прогестерона, фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) и соматотропного (СТГ) гормонов со стадией распространения неоплазии.

Методы. Для решения поставленных задач проведено комплексное клиничко-лабораторное обследование пациенток, находившихся на лечении в клинике факультетской хирургии и онкологии Саратовского ГМУ им. В.И. Разумовского (на базе НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Саратов II» ОАО «РЖД») в период с 2009 по 2011 г. Всего обследованы 128 пациенток с инфильтративно-протоковой узловой формой РМЖ на начальных и метастатических стадиях распространения неоплазии.

В связи с широким возрастным диапазоном наблюдаемого контингента больных (от 29 до 65 лет) считали целесообразным проведение сравнительной оценки изменений гормонального баланса в различных возрастных группах, причем одна группа сравнения включала больных с сохраненной овариально-менструальной функцией в возрасте 29–49 лет, а другая — в климактерическом и постменопаузальном возрастном периодах (50–65 лет).

Гормональный статус исследован в момент поступления пациенток в стационар до проведения комплексного лечения. В каждой возрастной группе также проводилось распределение больных на две подгруппы наблюдения в соответствии с Международной классификацией рака молочной железы по системе TNM. В одну из подгрупп наблюдения были включены 64 больные РМЖ без метастазов (I–IIA, T1–2N0M0 стадии). Другую подгруппу составили 64 пациентки с наличием регионарных метастазов

(IIB — IIIA, T1–3N1–2M0 стадии). Группу сравнения составили 64 женщины без клинически выраженных проявлений какой-либо патологии. Пациентки каждой группы наблюдения разделены, как указывалось, в соответствии с возрастными параметрами на две подгруппы по 32 человека в каждой.

Количественное определение содержания в сыворотке крови эстрадиола, эстриола, прогестерона, ФСГ, ЛГ, а также СТГ проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы «DRG» (Германия) и «Алкор Био» (Санкт-Петербург). Забор крови в группе менструальноактивных пациенток осуществлялся в фолликулиновой фазе цикла.

Результаты исследований обработаны с использованием программы «Медстат» (пакет программ для статистической обработки результатов медицинских и биологических наблюдений) с вычислением средней арифметической величины, среднеквадратичного отклонения, ошибки средней величины. Оценку достоверности средних величин проводили путем вычисления коэффициента достоверности Стьюдента, достоверными считали различия при $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$. Корреляционный анализ проводился с помощью критерия Спирмена. Достоверно значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты. Сравнительная оценка гормонального статуса при узловой форме РМЖ у пациенток с сохраненной овариально-менструальной функцией и пациенток в климактерическом и постменопаузальном периодах позволила выявить определенные особенности нарушений гормонального баланса в соответствии с возрастными параметрами и стадиями распространения опухолевого процесса.

Так, у больных узловой формой РМЖ с сохраненной овариально-менструальной функцией на начальных стадиях развития болезни не обнаружено изменений содержания в крови эстрадиола, в то время как уровень свободного эстриола резко снижался (табл. 1). Обращает на себя внимание факт одновременного резкого возрастания содержания в крови прогестерона, антагонизирующего ряд биологических эффектов эстрогенов.

В дальнейшем представляло интерес выяснить, как изменялись аналогичные показатели гормонального статуса у пациенток климактерического и постменопаузального периодов на ранних стадиях развития РМЖ (стадии T1N0M0, T1N0M0).

Как оказалось, в группе пациенток с начальными стадиями опухолевого процесса имело место некоторое снижение содержания прогестерона в крови в отличие от таковых показателей в группе пациенток активного репродуктивного возраста, где содержание прогестерона в крови возрастало. Одновременно имело место увеличение уровня эстрадиола в крови в отличие от такого же показателя группы пациенток с сохраненной овариально-менструальной функцией (табл. 2). Возрастание уровня эстрадиола — высокоактивной фракции эстрогенов — сочеталось со снижением содержания в крови эстриола — менее биологически активной фракции эстрогенов.

Важным аргументом, подтверждающим роль гиперэстрогении в патогенезе РМЖ, явились проведенные нами далее исследования гормонального баланса у пациенток различных возрастных групп на метастатических стадиях распространения неоплазии.

Как оказалось, в группе пациенток активного репродуктивного периода уровень прогестерона

Ответственный автор: Злобнова Ольга Александровна.
410012, г. Саратов, ул. Б. Казачья, 112.
Тел.: 89063146942
E-mail: olga.zlobnova@yandex.ru.

Таблица 1

Характер изменений гормонального статуса в динамике распространения неоплазии при узловой форме рака молочной железы у пациенток активного репродуктивного возраста (фолликулиновая фаза)

Исследуемый показатель	Контрольная группа		Группы наблюдения больных					
			I группа (пациентки с узловой формой РМЖ, стадии T1N0M0 и T2N0M0)			II группа (пациентки с узловой формой РМЖ с метастазами, стадии T2N1M0 и T2N2M0).		
	N	M±m	N	M±m	P	N	M±m	P
Прогестерон, нмоль/л	32	5,91±0,62	32	8,67±0,74	P<0,05	32	4,11±0,37	P<0,05 P1<0,001
Эстрадиол, пг/мл	32	64,02±5,46	32	62,88±5,86	P>0,5	32	121,51±11,69	P<0,001 P1<0,001
Свободный эстриол, пг/мл	32	2,2±0,219	32	0,64±0,014	P<0,001	32	0,63±0,075	P<0,001 P1>0,5
ФСГ, МЕ/л	32	9,16±0,89	32	9,11±0,91	P>0,5	32	9,36±0,87	P>0,5 P1>0,5
ЛГ, МЕ/л	32	17,21±1,51	32	16,83±1,62	P>0,5	32	17,09±1,69	P>0,5 P1>0,5
СТГ, нг/мл	32	5,25±0,54	32	7,18±0,61	P<0,05	32	8,98±0,75	P<0,001 P1>0,05

Примечание: P — рассчитано по отношению к соответствующим показателям группы контроля; P1 — рассчитано по отношению к соответствующим показателям крови больных с T1-2N0M0 стадиями этой же формы патологии.

Таблица 2

Характер изменений гормонального статуса в динамике распространения неоплазии при узловой форме рака молочной железы у пациенток климактерического и постменопаузального периодов

Исследуемый показатель	Контрольная группа		Группы наблюдения больных					
			I группа (пациентки с узловой формой РМЖ, стадии T1N0M0 и T2N0M0)			II группа (пациентки с узловой формой РМЖ с метастазами, стадии T2N1M0 и T2N2M0)		
	N	M±m	N	M±m	P	N	M±m	P
Прогестерон, нмоль/л	32	0,56±0,042	32	0,41±0,034	P<0,05	32	0,31±0,027	P<0,001 P1<0,05
Эстрадиол, Пг/мл	32	58,02±5,73	32	94,95±8,71	P<0,001	32	127,63±11,92	P<0,001 P1<0,05
Свободный, эстриол пг/мл	32	1,4±0,105	32	0,58±0,047	P<0,001	32	0,54±0,041	P<0,001 P1>0,5
ФСГ, МЕ/л	32	64,11±6,25	32	62,28±5,98	P>0,5	32	67,02±6,72	P>0,5 P1>0,5
ЛГ, МЕ/л	32	35,12±3,42	32	34,51±2,98	P>0,5	32	36,32±3,59	P>0,5 P1>0,5
СТГ, нг/мл	32	4,98±0,52	32	6,78±0,64	P<0,05	32	9,02±0,81	P<0,001 P1<0,05

Примечание: P — рассчитано по отношению к соответствующим показателям группы контроля; P1 — рассчитано по отношению к соответствующим показателям крови больных с T1-2N0M0 стадиями этой же формы патологии.

значительно снижался при одновременном резком возрастании уровня эстрадиола. Содержание же свободного эстриола оставалось низким, как и в группах наблюдения на начальных стадиях развития опухолевого процесса (см. табл. 1).

В другой возрастной группе пациенток климактерического и постменопаузального периодов имело место аналогичное снижение уровня прогестерона и эстриола на фоне резкого возрастания содержания эстрадиола (см. табл. 2).

Обращает на себя внимание тот факт, что в литературе отсутствуют систематизированные сведения об оценке характера центрогенных влияний со стороны гипоталамо-гипофизарной системы на периферические органы и ткани, в частности молочные железы, яичники. В связи с этим представляло инте-

рес выяснить, не связано ли развитие гормонального дисбаланса при РМЖ с изменением центрогенных регуляторных влияний со стороны гипоталамо-гипофизарной системы, в частности с нарушением содержания в крови ФСГ и ЛГ, СТГ

Как оказалось, у пациенток обеих возрастных групп содержание ФСГ и ЛГ в крови не превышало аналогичные показатели группы контроля, оставаясь в пределах норм и на начальных, и на метастатических стадиях неоплазии молочной железы (см. табл. 1 и табл. 2).

Последующие исследования были направлены на определение уровня в крови СТГ в обследуемых группах наблюдения в динамике распространения неоплазии при РМЖ. Целесообразность указанного исследования обусловлена тем, что СТГ является ве-

душим фактором роста клеток различной морфофункциональной организации не только в условиях нормы, но и при многих онкологических заболеваниях.

Результаты проведенных нами исследований позволили обнаружить прогрессирующее увеличение уровня СТГ в крови в обеих возрастных группах наблюдения, коррелирующее со стадией распространения РМЖ (см. табл. 1 и табл. 2).

Обсуждение. В ходе исследования установлено, что особенностью нарушения гормонального баланса на начальных стадиях развития РМЖ у пациенток в климактерическом и постменопаузальном периодах является резкое возрастание содержания в крови высокоактивной фракции эстрогенов — эстрадиола на фоне снижения уровня прогестерона и свободного эстриола. В группе больных с сохраненной овариально-менструальной функцией на фоне нормальных значений содержания в крови эстрадиола отмечен рост уровня прогестерона, а содержание свободного эстриола также оставалось стабильно низким.

Сравнительная оценка уровня эстрогенов и прогестерона в крови больных РМЖ на метастатических стадиях опухолевого процесса в различных возрастных группах выявила общие закономерности в виде резкого увеличения содержания в крови эстрадиола, независимо от возрастных особенностей пациенток, при одновременном падении прогестерона и эстриола.

Определяя значимость выявленных изменений, следует остановиться на данных литературы, касающихся функции изучаемых гормонов в условиях нормы и патологии. Как известно, эстрадиол представляет собой наиболее активную фракцию эстрогенов, обеспечивая дифференцировку и развитие эпителия протоков молочной железы, а также усиливает митотическую активность эпителия, индуцирует формирование акциуса, стимулирует васкуляризацию и увеличивает гидратацию соединительной ткани. Между тем эстриол представляет собой метаболит эстрадиола и эстрона, обладающий наименьшей биологической активностью [3, 5, 7].

Механизм активирующего влияния эстрогенов на молочную железу включает прямую стимуляцию клеточной пролиферации за счет воздействия на ДНК, на прямую за счет индукции синтеза факторов роста [8].

Прогестерон поддерживает циклическую пролиферацию молочных желез за счет стимулирования развития альвеол в нормальном менструальном цикле и в течение беременности. Прогестерон, являясь антагонистом эстрогенов, ограничивает их пролиферативный эффект [8, 9].

Естественно, возникает вопрос: какие органы и ткани у пациенток в постменопаузальном и климактерическом периодах могут быть источником интенсивного образования эстрогенов? В соответствии с данными литературы высокой эстрогенпродуцирующей способностью обладает жировая ткань. Тканевая конверсия фракций эстрогенов осуществляется при помощи фермента ароматазы, стимулируемой IL-6, TNF α , P γ E $_2$, в то же время малигнизированные клетки могут сами быть источником продукции эстрогенов [7].

Анализируя в целом результаты наших исследований характера и механизмов изменения гормонального баланса в динамике распространения неоплазии при узловой форме РМЖ, следует отметить тот факт, что иницирующие механизмы канцерогенеза при указанной патологии не связаны с нарушением функции гипоталамо-гипофизарной системы

и, соответственно, с изменением центральных гормональных влияний на половые и молочные железы. Вместе с тем становится очевидным нарушение взаимодействия периферических желез и гипоталамо-гипофизарной системы по принципу «обратной связи», когда перманентное нарастание эстрадиола в крови при РМЖ, прогрессирующее по мере распространения неоплазии, не подавляет продукции ФСГ.

Касаясь механизма повышения содержания в крови СТГ, усиливающегося по мере распространения неоплазии в различных возрастных группах, следует отметить, что продукцию СТГ в условиях нормы осуществляют не только соматотрофы аденогипофиза, но и специализированные элементы слизистой ЖКТ, а в условиях патологии — и малигнизированные клетки опухолей различной локализации. Последнее является одним из признаков молекулярно-клеточного атипизма опухолевых клеток.

Заключение. Ведущая роль в патогенезе РМЖ в различных возрастных группах больных (активного репродуктивного, климактерического и постменопаузального периодов) принадлежит развитию гормонального дисбаланса, при этом нарушается принцип «плюс-минус» взаимодействия между центральными гормональными влияниями, обеспечиваемыми за счет ФСГ, ЛГ, и уровнем содержания в крови эстрогенов и прогестерона, когда изменение их концентрации в крови не влияет на интенсивность продукции указанных тропных гормонов. В то же время развитие начальных стадий канцерогенеза и опухолевой прогрессии закономерно сочетается с нарастанием уровня эстрадиола в крови, снижением содержания прогестерона и эстриола, обнаруживающих параллелизм со стадией опухолевого процесса. В данном исследовании впервые выявлен факт увеличения содержания в крови больных РМЖ СТГ, прогрессирующего по мере метастазирования опухолевых клеток.

Конфликт интересов. Работа выполнена в рамках научно-исследовательской программы одного из направлений научной деятельности ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России: диагностика, лечение больных со злокачественными опухолями (140014-4), на базе кафедры патологической физиологии, а также хирургии и онкологии.

Библиографический список

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в 2010 году // Вестник РОНЦ им. Блохина РАМН. 2011. № 2 (прил. 1). С. 55–56.
2. Бернштейн Л.М. Гормональный канцерогенез. СПб.: Наука, 2000. 198 с.
3. Канцерогенез: патофизиологические и клинические аспекты / под общ. ред. В.М. Попкова, Н.П. Чесноковой, В.Ю. Барсукова. Саратов: СГМУ, 2011. 600 с.
4. Копнин Б.П. Современные представления о механизмах злокачественного роста // X Российский онкологический конгресс: матер. конгресса. М., 2006. С. 99–102.
5. PALB2, which encodes a BRCA2 interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene / N. Rahman, I. S. Seo, D. Thompson [et al.] // Nat. Genet. 2007. Vol. 39. P. 165–167.
6. Сравнительное изучение содержания рецепторов эстрогенов и прогестеронов в неизменной, опухолевой и метастатических тканях при раке молочной железы / Е. Е. Шамова, И. В. Кондакова, Е. М. Слонимская [и др.] // Сибирский онкологический журнал. 2008. № 4. С. 42–45
7. Pollard J.W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis // Nat. Rev. Cancer. 2004. P. 71–80.
8. Comparison of agespecific incidence rate patterns for different histopathologic types of breast carcinoma /

W. F. Anderson, K. C. Chu, S. Chang [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004. Vol. 13. P. 1128–1135.

9. Garcia Closas M., Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14, № 2. P. 8000–8009.

Translit

1. Davydov M. I., Aksel E. M. Statistika zbolevaemosti i smertnosti ot zlokachestvennyh novoobrazovanij v 2010 godu // *Vestnik RONC im. Blohina RAMN.* 2011. № 2 (pril. 1). S. 55–56.

2. Bernshtejn L. M. *Gormonalnyj kancerogenez.* SPb.: Nauka, 2000. 198 s.

3. *Kancerogenez: patofiziologicheskie i klinicheskie aspekty / pod obw. red. V. M. Popkova, N. P. Chesnokovoj, V. Ju. Barsukova.* Saratov: SGMU, 2011. 600 s.

4. Kopnin B. P. Sovremennye predstavlenija o mehanizmah zlokachestvennogo rosta // *H Rossijskij onkologicheskij kongress: mater. kongressa.* M., 2006. S. 99–102.

5. PALB2, which encodes a BRCA2 interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene / N. Rahman, I. S. Sea, D. Thompson [et al.] // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39. P. 165–167.

6. Sravnitelnoe izuchenie soderzhanija receptorov jestro-genov i progesteronov v neizmenennoj, opuholevoj i metastaticheskijh tkanjah pri rake molochnoj zhelezy / E. E. Shashova, I. V. Kondakova, E. M. Slonimskaja [i dr.] // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2008. № 4. S. 42–45

7. Pollard J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis // *Nat. Rev. Cancer.* 2004. R. 71–80.

8. Comparison of agespecific incidence rate patterns for different histopathologic types of breast carcinoma / W. F. Anderson, K. C. Chu, S. Chang [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004. Vol. 13. P. 1128–1135.

9. Garcia Closas M., Chanock S. Genetic susceptibility loci for breast cancer by estrogen receptor status // *Clin. Cancer Res.* 2008. Vol. 14, № 2. P. 8000–8009.