



УДК 612.017.1-02:616.314.17-008.1-06:616.379-008.64

DOI 10.11603/2311-9624.2019.3.10446

© О. Ю. Баліцька, Ю. І. Бондаренко, Г. Г. Габор

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України  
kindratska@tdmu.edu.ua

## Активність гуморальної ланки адаптивної імунної системи у хворих на хронічний генералізований пародонтит і цукровий діабет 2 типу

### ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції/Received:  
02.09.2019 р.

**Ключові слова:** цукровий діабет 2 типу; хронічний пародонтит; гуморальний імунітет.

### АНОТАЦІЯ

**Резюме.** Системні зміни при цукровому діабеті можуть спричиняти локальні патологічні процеси, у тому числі з боку природженої імунної системи та адаптивної гуморальної імунної відповіді, які причетні до розвитку пародонтиту. Тому на даному етапі дослідження виникла необхідність більш глибокого вивчити механізми розвитку і перебігу хронічного генералізованого пародонтиту на тлі цукрового діабету.

**Мета дослідження** – з'ясувати характер реакції гуморальної ланки адаптивного імунітету в пацієнтів із хронічним генералізованим пародонтитом, цукровим діабетом 2 типу та при їх поєднанні.  
**Матеріали і методи.** Проведено обстеження 20 практично здорових осіб (контрольна група), 36 хворих із клінічно встановленим діагнозом цукрового діабету 2 типу (ЦД), 32 пацієнтів із підтвердженим діагнозом хронічного генералізованого пародонтиту (ХГП) і 32 хворих з поєднаним ЦД і ХГП (четверта група). Вміст основних класів імуноглобулінів IgA, IgG і IgM встановлювали за G. Manchini, рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) – за методом В. Гашкової у модифікації Ю. Гриневича.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Рівень IgA й IgG у дослідних групах був вірогідно вищим стосовно даних контрольної групи. Рівень IgM у другій групі був статистично значимо нижчий у 1,2 раза, а в третій і четвертій групах він був вірогідно вищий відповідно в 1,7 і 1,2 раза. Про те, що ЦД 2 типу ускладнює перебіг пародонтиту свідчить і концентрація імунних комплексів. При цьому найнижчий рівень ЦІК виявлено в групі хворих із ХГП, а найвищий – при поєднанні патологій.

**Висновки.** При хронічному генералізованому пародонтиті на тлі цукрового діабету 2 типу суттєвих змін зазнає гуморальна ланка адаптивної імунної системи, свідченням чого є підвищення в сироватці крові концентрації імуноглобулінів класів А, М, G та циркулюючих імунних комплексів.

**Вступ.** Пародонтит розглядають як запальне захворювання тканин пародонтального комплексу, що спричинене специфічними мікроорганізмами, які призводять до прогресуючої

деструкції оболонки пародонта й альвеолярної кістки з формуванням пародонтальних кишень і рецесії ясен [1]. Доведено, що імунна реакція відіграє вирішальну роль в ініційован-

ні та прогресуванні захворювань пародонта [2]. В останнє десятиріччя спостерігають інтенсивний пошук потенційних взаємозв'язків між пародонтитом і різними хронічними патологіями. Результати епідеміологічних досліджень показали високу поширеність пародонтиту серед осіб із цукровим діабетом [3]. Linden et al. повідомили, що пародонтит може бути фактором ризику для деяких хронічних захворювань, у тому числі й цукрового діабету [4]. Варто відмітити, що до загальних факторів ризику, з якими пов'язують розвиток цукрового діабету, відносять також тютюнокуріння, неправильне харчування, ожиріння, низька фізична активність, надмірне вживання алкоголю [5].

Цукровий діабет 2 типу (ЦД2) є багатофакторним метаболічним захворюванням, що характеризується гіперглікемією через інсулінову недостатність або інсулінорезистентність [6]. Поряд з тим ЦД2 розглядають як хронічне, запальне захворювання, зумовлене тривалим порушенням імунної системи, метаболічним синдромом або ожирінням [7]. З патогенетичної точки зору діабет асоціюється з порушенням захисних систем організму, включаючи імунний та антиоксидантний захист [8]. Системні зміни при цукровому діабеті можуть спричинити локальні патологічні зміни, у тому числі з боку імунної відповіді, які мають вагоме значення у розвитку пародонтиту. Тому виникла необхідність більш глибокого дослідження механізмів розвитку і перебігу хронічного генералізованого пародонтиту на тлі цукрового діабету.

**Метою дослідження** було з'ясувати характер реакції гуморальної ланки адаптивного імунітету в пацієнтів із хронічним генералізованим пародонтитом, цукровим діабетом 2 типу та при їх поєднанні.

**Матеріали і методи.** Проведено обстеження 68 хворих із клінічно встановленим діагнозом цукрового діабету 2 типу (ЦД) (із них у 32 додатково діагностовано хронічний генералізований пародонтит), які перебували на стаціонарному лікуванні в ендокринологічних й терапевтичних відділеннях лікарень м. Тернополя, а також 32 пацієнтів із підтвердженим хронічним генералізованим пародонтитом (ХГП). Встановлення діагнозу захворювань тканин пародонта проводили на основі даних анамнезу, клінічного обстеження, за допомогою визначення гігієнічних і пародонтальних індексів, рентгенологічного дослідження, від-

повідно до класифікації захворювань пародонта М. Ф. Данилевського (2000) [9]. Осіб, які були включені в дослідження, поділили на 4 групи: перша контрольна – 20 осіб із клінічно здоровим пародонтом, без вираженої загальносоматичної патології, друга – 36 пацієнтів із ЦД 2 типу, третя – 32 хворих на ХГП і четверта група – 32 пацієнтів з ЦД 2 типу і ХГП.

Вміст основних класів імуноглобулінів IgA, IgG і IgM встановлювали методом радіальної імунодифузії в гелі з використанням моноспецифічних антисироваток за G. Manchini (Manchini G., 1965). Рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові визначали за методом В. Гашкової (1977) у модифікації Ю. Гриневича і співавт. (1986).

Дані проведених обстежень опрацьовували статистично, використовуючи програму «Statistica 8» (StatSoft, США). Для перевірки на відповідність вибірок даних нормальному закону розподілу було застосовано розрахунок критерію Шапіро–Уїлка. У зв'язку з відсутністю відповідності даних нормальному розподілу на рівні значимості  $p \leq 0,05$  обчислювали середньовибіркові характеристики: медіану (Me), першу і третю квартилі (Q25–Q75). Рівень статистичної значущості відмінностей вибірок оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна–Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при досягнутому рівні  $p \leq 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** Результати проведених досліджень вказують на дисбаланс фракцій імуноглобулінів за умов досліджуваних патологій (табл.). Так, рівень IgA у другій групі був вірогідно вищим в 1,7 раза, у третій – в 1,6 раза і в четвертій – у 2,0 раза стосовно даних контрольної групи ( $p < 0,001$ ). Рівень IgM у другій групі був статистично значимо нижчий в 1,2 раза, тоді як у третій і четвертій групах він був вірогідно вищий відповідно в 1,7 і 1,2 раза. Рівень IgG був більшим у другій та третій групах – в 1,3 раза і в четвертій групі – у 2,0 рази відповідно до контрольних значень ( $p < 0,05$ ).

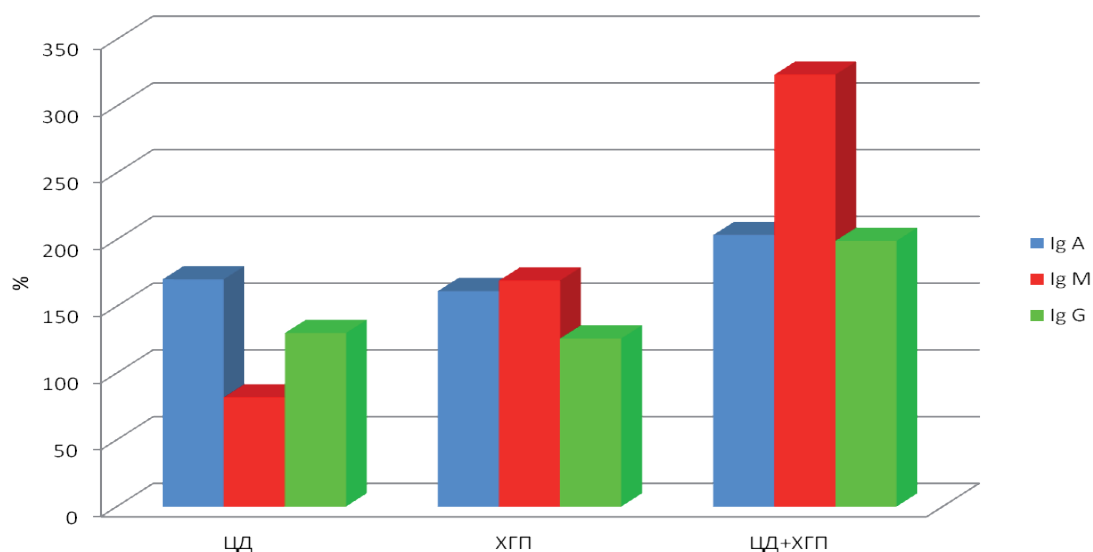
Як свідчать результати досліджень, показані на рисунку 1, реакція гуморальної ланки адаптивної імунної системи при ЦД 2 типу, ХГП та їх поєднанні була різною. Найменш значні зміни виявлено при ХГП, тоді як при поєднанні досліджуваних патологій, вони були найбільш вираженими, особливо з боку титру IgM. Отримані дані дозволяють припустити, що глибина змін показників гуморальної

## Експериментальні дослідження

**Таблиця.** Вміст імуноглобулінів у крові хворих на хронічний генералізований пародонтит на тлі цукрового діабету 2 типу, Me [Q25–Q75]

Показник	Група обстеження			
	перша (контрольна) n=20	друга (ЦД, 2 тип) n=36	третя (ХГП) n=32	четверта (ЦД+ХГП) n=32
IgA (г/л)	1,83 [1,61;2,10]	3,12* [2,88;3,26]	2,96* [2,85;3,07]	3,73*^# [3,54;4,08]
IgM (г/л)	1,11 [0,83;1,31]	0,90* [0,64;1,17]	1,87* [1,60;2,09]	3,58*# [3,10;4,09]
IgG (г/л)	11,13 [9,19;12,58]	14,47* [13,92;15,07]	14,02* [12,32;15,42]	22,15*^# [20,89;23,22]

Примітки: 1) \* – достовірні відмінності порівняно з контрольною групою,  $p < 0,05$ ; 2) ^ – достовірні відмінності між другою і четвертою групами,  $p < 0,001$ ; 3) # – достовірні відмінності між третьою і четвертою групами,  $p < 0,001$ .



**Рис. 1.** Співвідношення різних класів імуноглобулінів у крові хворих на хронічний генералізований пародонтит на тлі цукрового діабету 2 типу.

ланки адаптивної імунної системи при ХГП на тлі ЦД 2 типу залежить, насамперед, від концентрації глюкози в крові й тривалості хронічної гіперглікемії. Враховуючи, що за умов хронічної гіперглікемії в організмі змінюються антигенні властивості тканин, розвиваються запально-деструктивні процеси, що і може бути стимулом для посиленого продукування імуноглобулінів при хронічному генералізованому пародонтиті на тлі цукрового діабету 2 типу.

Дослідники також відзначають, що більш висока концентрація IgA, яку спостерігають у пацієнтів із діабетом, може бути результатом імунної відповіді на кінцеві продукти глікозилювання, збільшення і накопичення яких зумовлене стійким високим рівнем глюкози в крові. Крім того повідомляється, що IgA є неспецифічним маркером у розвитку діабетичних ускладнень [10]. Зростання рівня IgG серед хворих на цукровий діабет 2 типу може бути результатом хронічної метаболічної дис-

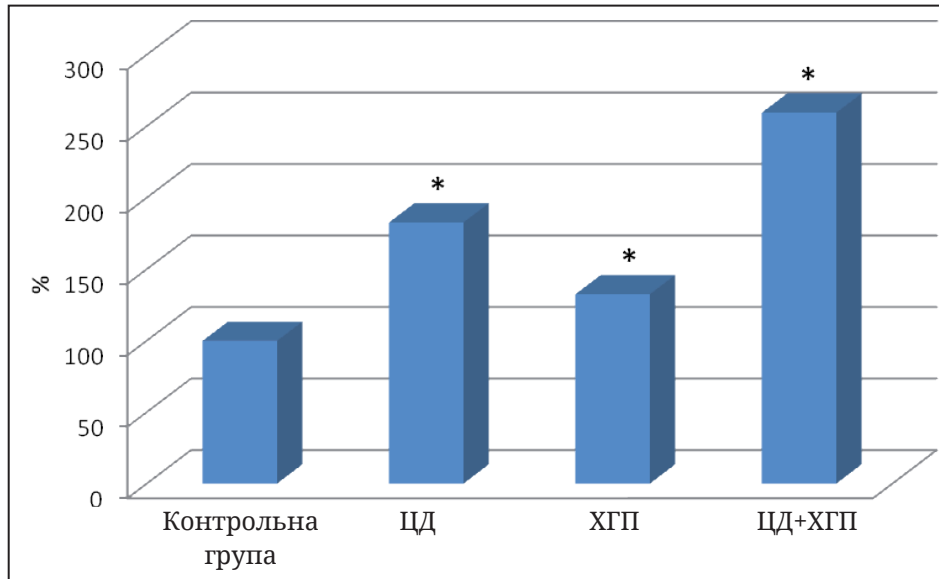
функції із супутнім низьковираженим запаленням [11, 12].

Підвищення рівня імуноглобулінів у хворих на цукровий діабет і пародонтит відбувається, найімовірніше, внаслідок активації клітинних елементів природженого імунітету за умови тривалої стимуляції їх бактеріальними антигенами при хронічних захворюваннях пародонта та стимулювання продукції імуноглобулінів через цитокінову ланку імуногенезу. J. Kranthi et al. повідомляють, що збільшення концентрації IgM при поєднанні ЦД і ХГП пов'язане з посиленою відповіддю імунної системи на діабетичний статус при пародонтиті [13]. Підвищена частота пародонтиту в пацієнтів із цукровим діабетом свідчить про те, що зміна імунної відповіді може сприяти розвитку пародонтиту в хворих із діабетом [14, 15].

Про те що цукровий діабет 2 типу може ускладнювати перебіг пародонтиту, свідчить і підвищена концентрація імунних комплек-

сів (рис. 2). Так, у другій дослідній групі рівень ЦІК становив 123,32 [115,3;130,2] ум. од., у третій – 89,45 [81,4;96,7] ум. од. і в четвертій – 175,1 [168,7;186,4] ум. од., що перевищувало контрольні значення відповідно в 1,8; 1,3 і 2,6 рази ( $p < 0,01$ ). При цьому найнижчий рівень ЦІК

виявлено в групі хворих на ХГП, а найвищий – при поєднанні патологій. Так, при поєднаній патології концентрація ЦІК була на 127,0 вищою ( $p < 0,001$ ), ніж при окремо взятому пародонтиті, та на 76,8 % – ніж при окремо взятому діабеті ( $p < 0,001$ ).



**Рис. 2.** Співвідношення концентрації циркулюючих імунних комплексів у крові хворих на цукровий діабет 2 типу, хронічний генералізований пародонтит та їх поєднанні.

*Примітка.* \* – достовірність відмінності порівняно з контрольною групою.

Доведено, що при ХГП на тлі ЦД 2 типу відбувається порушення функціонування гуморальної ланки адаптивної імунної системи, що проявляється зростанням вмісту імуноглобулінів й циркулюючих імунних комплексів у кров'яному руслі.

**Висновки.** При хронічному генералізованому пародонтиті на тлі цукрового діабету 2 типу суттєвих змін зазнає гуморальна ланка адаптивної імунної системи, свідченням чого є підвищення в сироватці крові концентрації імуноглобулінів класів А, М, G та циркулюючих імунних комплексів.

©О. Ю. Балицкая, Ю. И. Бондаренко, Г. Г. Габор

Тернопольский национальный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины

## Активность гуморального звена адаптивной иммунной системы у больных хроническим генерализованным пародонтитом и сахарным диабетом 2 типа

**Резюме.** Системные изменения при сахарном диабете могут вызвать локальные патологические процессы, в том числе со стороны врожденной иммунной системы и адаптивного гуморального иммунного ответа, причастных к развитию пародонтита. Поэтому на данном этапе исследования возникла необходимость более глубокого изучить механизмы развития и течения хронического генерализованного пародонтита на фоне сахарного диабета.

**Цель исследования** – выяснить характер реакции гуморального звена адаптивного иммунитета в пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом, сахарным диабетом 2 типа и при их сочетании.

**Материалы и методы.** Проведено обследование 20 практически здоровых лиц (контрольная группа), 36 больных с клинически установленным диагнозом сахарного диабета 2 типа (СД), 32 пациентов

с подтвержденным диагнозом хронического генерализованного пародонтита (ХГП) и 32 больных с совмещенным СД и ХГП (четвертая группа). Содержание основных классов иммуноглобулинов IgA, IgG и IgM устанавливали по G. Manchini, уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) – по методу В. Гашковой в модификации Ю. Гриневича.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Уровень IgA и IgG в опытных группах был достоверно выше относительно данных контрольной группы. Уровень IgM во второй группе был статистически значимо ниже в 1,2 раза, а в третьей и четвертой группах он был достоверно выше соответственно в 1,7 и 1,2 раза. О том, что СД 2 типа осложняет течение пародонтита, свидетельствует и концентрация иммунных комплексов. При этом самый низкий уровень ЦИК выявлено в группе больных ХГП, а самый высокий – при сочетании патологий.

**Выводы.** При хроническом генерализованном пародонтите на фоне сахарного диабета 2 типа существенные изменения претерпевает гуморальное звено адаптивной иммунной системы, свидетельством чего является повышение в сыворотке крови концентрации иммуноглобулинов классов А, М, G и циркулирующих иммунных комплексов.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа; хронический пародонтит; гуморальный иммунитет.

©О. Yu. Balitska, Yu. I. Bondarenko, H. H. Habor

Horbachevskiy Ternopil National Medical University

## Activity of the humoral link of adaptive immune system in patients with chronic generalized periodontitis and type 2 diabetes

**Summary.** Systemic changes in diabetes can cause local pathological processes, including those from the innate immune system and the adaptive humoral immune response, involved in the development of periodontitis. Therefore, at this stage of the study, the need arose for a deeper study of the mechanisms of development and course of chronic generalized periodontitis in the presence of diabetes mellitus.

**The aim of the study** – to elucidate the nature of the reaction of the humoral link of adaptive immunity in patients with chronic generalized periodontitis, type 2 diabetes mellitus and their combination.

**Materials and Methods.** A survey was conducted on 20 practically healthy individuals (control group), 36 patients with a clinically established diagnosis of type 2 diabetes mellitus (DM), 32 patients with a confirmed diagnosis of chronic generalized periodontitis (CGP), and 32 patients with combined diabetes and CGP (group 4). The content of the main classes of immunoglobulins IgA, IgG and IgM was determined according to G. Manchini, the level of circulating immune complexes (CEC) was determined according to the method of V. Hashkov in the modification of Yu. Hrynevych.

**Results and Discussions.** The level of Ig A and Ig G in the experimental groups was significantly higher relative to the control group. The Ig M level in group 2 was statistically significantly lower by 1.2 times, and in groups 3 and 4 it was significantly higher by 1.7 and 1.2 times, respectively. The fact that type 2 diabetes complicates the course of periodontitis is also evidenced by the concentration of immune complexes. In this case, the lowest level of CEC was detected in the group of patients with CGP, and the highest – with a combination of pathologies.

**Conclusions.** In chronic generalized periodontitis in the presence of type 2 diabetes mellitus, the humoral link of the adaptive immune system undergoes significant changes, as evidenced by an increase in blood serum concentrations of class A, M, G immunoglobulins and circulating immune complexes.

**Key words:** type 2 diabetes mellitus; chronic periodontitis; humoral immunity.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Amassi B. Y. Oral hygiene practice of adult diabetic patients and their awareness about oral health problems related to diabetes / B. Y. Amassi, R. S. Dakheel // Journal of Dentistry and Oral Hygiene. – 2017. – No. 9 (2). – P. 8–14.
2. Jebouri M. Interactions of immunological parameters among patients with periodontal disease / M. Jebouri, H. Hadeethi // International Scientific Conference and Annual Meeting of the Brazilian Association of Allergy and Immunology. – 2014.
3. Taylor G. W. Diabetes, periodontal diseases, dental caries, and tooth loss: A review of the literature / G. W. Taylor, M. C. Manz, W. S. Borgnakke // Compend. Contin. Educ. Dent. – 2004. – No. 25 (3). – P. 179–184.
4. All-cause mortality and periodontitis in 60–70-year-old men: a prospective cohort study / G. J. Linden, K. Linden, J. Yarnell [et al.] // Journal of Clinical Periodontology. – 2012. – No. 39. – P. 940–946.

5. Антонишин І. В. Стан пероксидного окиснення ліпідів при експериментальному дієтіндукованому аліментарному ожирінні / І. В. Антонишин, М. І. Марущак, О. В. Денефіль // *Медична хімія*. – 2014. – № 16 (3). – С. 61–65.
6. The mechanisms of apoptosis initiation in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes / M. Marushchak, N. Lisnianska, I. Krynytska, I. Chornomydz // *Georgian Medical News*. – 2017. – No. (270). – P. 125–130.
7. Xia C. Role of T lymphocytes in type 2 diabetes and diabetes-associated inflammation / C. Xia, X. Rao, J. Zhong // *Journal of Diabetes Research*. – 2017. – ID 6494795.
8. Баліцька О. Ю. Активність процесів пероксидації ліпідів у хворих на хронічний генералізований пародонтит і цукровий діабет 2 типу / О. Ю. Баліцька, Ю. І. Бондаренко, Г. Г. Габор // *Вісник наукових досліджень*. – 2018. – № 3. – С. 98–101.
9. Данилевский Н. Ф. Заболевания пародонта / Н. Ф. Данилевский, А. В. Борисенко. – К. : Здоровье, 2000. – 464 с.
10. High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus: agewise distribution and relation to chronic complications / S. Rodriguez-Segade,

- M. F. Camina, A. Carnero [et al.] // *Clin. Chem.* – 1996. – No. 42 (7). – P. 1064–1067.
11. Altered immunoglobulins (A and G) in Ghanaian patients with type 2 diabetes / H. Asare-Anane, C. P. K. Botchey, E. K. Ofori [et al.] // *SAGE Open Medicine*. – 2018. Access mode : <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2050312118762042>
12. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control / A. Y. Peleg, T. Weerarathna, J. S. McCarthy [et al.] // *Diabetes Metab. Res. Rev.* – 2007. – No. 23. – P. 3–13.
13. Comparison of the serum immunoglobulin IgM level in diabetic and nondiabetic patients with chronic periodontitis / J. Kranthi, K. Sudhakar, R. Kulshrestha [et al.] // *J. Contemp. Dent. Pract.* – 2013. – No. 14 (5). – P. 814–818.
14. Estimation of humoral immunological parameters among chronic periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus / B. H. Ghurabi, Z. A. Aldhafer, V. S. A. Azawy, S. Talal // *Journal of Natural Sciences Research*. – 2015. – No. 5, 10. – P. 127–131.
15. Awartani F. Serum immunoglobulin levels in type 2 diabetes patients with chronic periodontitis / F. Awartani // *Journal of Contemporary Dental Practice*. – 2010. – No. 11 (3). – P. 1–8.

## REFERENCES

1. Amassi, B.Y., & Dakheel, R.S. (2017). Oral hygiene practice of adult diabetic patients and their awareness about oral health problems related to diabetes. *Journal of Dentistry and Oral Hygiene*, 9 (2), 8-14.
2. Jebouri, M., & Hadeethi, H. (2014). Interactions of immunological parameters among patients with periodontal disease. *International Scientific Conference and Annual Meeting of the Brazilian Association of Allergy and Immunology*.
3. Taylor, G.W., Manz, M.C., & Borgnakke, W.S. (2004). Diabetes, periodontal diseases, dental caries, and tooth loss: A review of the literature. *Compend. Contin. Educ. Dent.*, 25 (3), 179-184.
4. Linden, G.J., Linden, K., Yarnell, J., Evans, A., Kee, F., & Patterson, C.C. (2012). All-cause mortality and periodontitis in 60–70-year-old men: a prospective cohort study. *Journal of Clinical Periodontology*, 39, 940-946.
5. Antonyshyn, I.V., Maruschak, M.I., & Denefil, O.V. (2014). Stan peroksydnoho okysnennia lipidiv pry eksperymentalnomu diietindukovanomu alimentarnomu ozhyrinni [State of lipid peroxide oxidation in experimental diet-induced alimentary obesity]. *Medychna khimiia – Medical Chemistry*, 16 (3), 61-65 [in Ukrainian].
6. Marushchak, M., Lisnianska, N., Krynytska, I., & Chornomydz, I. (2017). The mechanisms of apoptosis initiation in rats with chronic enterocolitis combined with streptozotocin-induced diabetes. *Georgian Medical News*, (270), 125-130.
7. Xia, C., Rao, X., & Zhong, J. (2017). Role of T lymphocytes in type 2 diabetes and diabetes-associated inflammation. *Journal of Diabetes Research*, ID 6494795.
8. Balitska, O.Yu., Bondarenko, Yu.I., & Habor, H.H. (2018). Aktyvnist protsesiv peroksydatsii lipidiv u khvorykh na

- khronichniy heneralizovanyi parodontyt i tsukrovyy diabet 2 typu [Activity of lipid peroxidation processes in patients with chronic generalized periodontitis and type 2 diabetes]. *Visnyk naukovykh doslidzhen – Bulletin of Scientific Research*, 3, 98-101 [in Ukrainian].
9. Danylevskyy, N.F., & Borysenko, A.V. (2000). *Zabolevaniya parodonta [Periodontal disease]*. Kyiv: Zdorovia [in Russian].
10. Rodriguez-Segade, S., Camina, M.F., & Carnero, A. (1996). High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus: agewise distribution and relation to chronic complications. *Clin. Chem.*, 42 (7), 1064-1067.
11. Asare-Anane, H., Botchey, C.P.K., & Ofori, E.K. (2018). Altered immunoglobulins (A and G) in Ghanaian patients with type 2 diabetes. *SAGE Open Medicine*. Retrieved from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2050312118762042>
12. Peleg, A.Y., Weerarathna, T., & McCarthy, J.S. (2007). Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 23, 3-13.
13. Kranthi, J., Sudhakar, K., Kulshrestha, R., Raju, P.K., Razdan, A., & Srinivasa, T. (2013). Comparison of the serum immunoglobulin IgM level in diabetic and nondiabetic patients with chronic periodontitis. *J. Contemp. Dent. Pract.*, 14 (5), 814-818.
14. Ghurabi, B.H., Aldhafer, Z.A., Azawy, V.S.A., & Talal, S. (2015). Estimation of humoral immunological parameters among chronic periodontitis patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Natural Sciences Research*, 5, 10, 127-131.
15. Awartani, F. (2010). Serum immunoglobulin levels in type 2 diabetes patients with chronic periodontitis. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 11 (3), 1-8.