

ترشح فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) در کشت سه بعدی بافت اندومتریوم انسان: یک مدل اندومتریوز خارج از بدن

جعفر آی (Ph.D.)^{۱*}، نوید اسفندیاری (Ph.D.)^۲، رابرت کاسپر (Ph.D.)^۳

۱- گروه مهندسی بافت، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تهران، تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی در پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تهران، تهران، ایران
۳- بخش زنان و زایمان، انستیتو تحقیقاتی ساموئل لنتفلد، دانشگاه تورنتو، تورنتو، کانادا

چکیده

زمینه و هدف: اندومتریوز بیماری است که طی آن غدد و عروق رحمی در بیرون از حفره رحمی به صورت نابجا رشد می‌کنند. این بیماری در حدود ۱۰٪ از زنان در سن باروری و در حدود ۵۰٪ از زنان نابارور دیده می‌شود. عمل جراحی یکی از درمان‌های رایج این بیماری است که البته بعد از عمل جراحی، بیماری می‌تواند دوباره عود کند. فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF)، از فاکتورهای مؤثر در ایجاد بیماری به شمار می‌آید. هدف از تحقیق حاضر، تعیین میزان ترشح فاکتور رشد اندوتلیال رگی (VEGF) در اندومتریوم کشت شده در محیط کشت سه بعدی با ماتریکس فیبرینی می‌باشد.

روش بررسی: نمونه‌ها از اندومتریوم تنه رحم ۱۰ زن که در روزهای ۲۴-۱۹ سیکل رحمی بودند و جهت درمان ناباروری، کیست‌های تخمدانی و سایر علل غیر رحمی مراجعه کننده به مرکز تکنولوژی تولیدمثل نوین تورنتو، تهیه شد. هر نمونه بافت اندومتریوم به ۱۰ قطعه جهت کشت در چاهک‌های پلیت کشت تقسیم شد (جمعاً ۱۰۰ چاهک). نمونه‌ها با استفاده از روش کشت سه بعدی بافت، کشت داده شدند و مایع بالایی هر نمونه از کشت، جهت اندازه‌گیری سطح VEGF جمع‌آوری شد؛ سپس نمونه‌های اندومتریوم کشت داده شده جهت شناسایی رگزایی به روش ایمونوهیستوشیمیایی بوسیله آنتی‌بادی Anti-Cox2 رنگ‌آمیزی شدند. لازم به ذکر است که داده‌های مربوط به درصد تکثیر سلولها و درصد رگزایی، با استفاده از آنالیز آماری t و داده‌های مربوط به میزان ترشح VEGF، با استفاده از آزمون t داده‌پردازی شدند.

نتایج: سطح VEGF در مایع رویی کشت سه بعدی موجود در چاهک‌هایی که رگزایی در آنها دیده شده بود ($492 \pm 3/11$)، افزایش معنی‌داری ($p < 0/05$) را نسبت به چاهک‌های فاقد رگزایی ($183 \pm 2/13$) نشان داد. نتایج نشان‌دهنده تکثیر سلولها در ۹۱٪ از چاهکها بود و همچنین رگزایی در ۵۱ چاهک (۵۶٪) از چاهک‌های دارای تکثیر سلولی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: ترشح VEGF، دارای نقش مهمی در ایجاد رگزایی و احتمالاً رشد و تکثیر سلول‌های بافت اندومتریوم می‌باشد؛ لذا احتمالاً ترشح VEGF می‌تواند در ایجاد بیماری اندومتریوز تأثیر داشته باشد. در ضمن پیشنهاد می‌گردد رابطه بین تکثیر سلولها و میزان ترشح VEGF نیز توسط محققان دیگر مورد بررسی قرار گیرد.

کلید واژگان: اندومتریوز، اندومتریوم، رگزایی، فاکتور رشد اندوتلیال رگی، کشت سه‌بعدی، کشت بافت، ناباروری زنان.

* **مسئول مکاتبه:** دکتر جعفر آی، گروه مهندسی بافت، دانشکده فن‌آوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تهران، خیابان ایتالیا، تهران، ایران.

پست الکترونیک: jafar_ai@tums.ac.ir

دریافت: ۸۷/۱۰/۱۰ پذیرش: ۸۸/۲/۱۹

زمینه و هدف

بیماری اندومتريوز که رشد نابجای غدد و عروق بافت اندومتريوم در خارج از حفره رحمی است (۱)، اغلب با دردهای ناحیه لگن همراه می‌باشد (۲،۳). اولین اقدام درمانی در این بیماری، عمل جراحی می‌باشد که در حدود ۴۷٪ موارد بعد از درمان، بیماری دوباره عود می‌کند (۳). در حیواناتی مثل بابون (نوعی پستاندار)، بیماری اندومتريوز در مرحله ترشحي سيكل رحمی دیده می‌شود (۴). اخیراً مطالعات نشان داده است که می‌توان اندومتريوز را به صورت پیوند در حیواناتی مثل موش ایجاد کرد (۵). بیماری اندومتريوز شبیه به تومورها دارای دو مرحله اساسی لانه‌گزینی و رگزایی می‌باشد (۶).

برگشت خون قاعدگی در لوله‌های رحم، یک پدیده فیزیولوژی است که در بعضی از زنان دیده می‌شود (۷،۸) و می‌تواند باعث انتقال سلول‌های اندومتريوم به منطقه پريتونئوم لگن و جایگزینی آنها در آن منطقه شده و موجب ایجاد بیماری اندومتريوز گردد. ولی در همه زنانی که برگشت خون قاعدگی در لوله رحم رخ می‌دهد، بیماری اندومتريوز دیده نمی‌شود و این بیانگر دخالت فاکتورهای دیگر در بروز این بیماری می‌باشد (۹). سلول‌های بافت اندومتريوم، می‌توانند در کشت سه بعدی با ماتریکس فیبرینی، تکثیر و رشد یافته و مکانیسمی شبیه به بیماری اندومتريوز از جمله رگزایی و تکثیر سلولها را در خارج از بدن به نمایش بگذارند (۱۰،۱۱).

رگزایی به عنوان اصلی‌ترین عامل ایجاد بیماری اندومتريوز شمرده می‌شود (۱۲). VEGF^۱ یکی از مهمترین فاکتورها در اندومتريوم می‌باشد که باعث رگزایی می‌شود (۱۳). سطح بالای VEGF بعنوان عامل اصلی در رگزایی پاتولوژی از جمله رشد تومورهای بدخیم و تخریب عضلات شناخته شده است (۱۴).

Yoo و همکاران اظهار نمودند که VEGF بهترین فاکتور جهت تنظیم آنژیوژنز می‌باشد و فاکتورهای Anti-VEGF را به عنوان مهار کننده‌های آنژیوژنز مطرح کردند (۱۵). همچنین Lieb و همکاران نشان دادند که افزایش سطح VEGF، باعث افزایش سطح آنژیوژنز در مفاصل می‌شود (۱۶).

هدف از مطالعه حاضر، کشت بافت اندومتريوم در محیط کشت سه بعدی با ماتریکس فیبرینی جهت تکثیر سلول‌های بافت اندومتريوم و ایجاد رگزایی، به عنوان مدل اندومتريوز در خارج از بدن و اندازه‌گیری سطح VEGF و بررسی نقش این فاکتور در ایجاد بیماری اندومتريوز می‌باشد.

روش بررسی

نمونه‌های اندومتريوم، از ۱۰ بیمار مراجعه کننده جهت درمان ناباروری، کیست تخمدانی، فیبریوم، میوم و سایر علل ناباروری به مرکز تکنولوژی نوین تولیدمثل تورنتو تهیه شد. این بیماران فاقد بیماری‌هایی از قبیل سرطان رحم و یا پولیپ بوده و در سه ماه قبل از نمونه‌برداری، از داروهای هورمونی استفاده نکرده بودند. قبل از نمونه‌برداری از بیماران فرم مربوط به کمیته اخلاق پزشکی اخذ شد که در آن فرم توضیحات لازم جهت تحقیق حاضر به اطلاع آنها رسیده بود. بیماران شرکت کننده در پژوهش در روزهای ۲۴-۱۹ سیکل رحمی قرار داشتند و تاریخ سیکل رحمی بیماران بر اساس آخرین روز خونروش آنها محاسبه گردید.

کشت سه بعدی بافت: هر نمونه بافت اندومتريوم به ۱۰ قطعه یک میلی‌متری تقسیم (جمعاً ۱۰۰ قطعه) و با محلول Hanks حاوی آنتی‌بیوتیک (Sigma, USA) شستشو داده شد. سپس قطعات بافتی در ظروف کشت دارای ۲۴ چاهک (Nunc, USA) کشت داده شدند. لازم به ذکر است که جهت کشت نمونه‌ها، یک لایه ژل فیبرینی در زیر و یک لایه ژل فیبرینی در روی آن قرار

داده شد (مدل ساندویچی). جهت تهیه ژل فیبرین، از محلول فیبرینوژن (Sigma, USA) استفاده شد و برای تهیه محلول فیبرینوژن از محیط کشت M199 حاوی 2mg/ml فیبرینوژن (GIBCO, USA) و $10\ \mu\text{l}$ ترومبین با غلظت 0.15M (Sigma, USA) استفاده گردید. سپس ظروف کشت برای مدت چهار هفته در انکوباتور (Memmert Company) با حرارت 37°C و دی اکسید کربن 5% و رطوبت 95% قرار داده شد.

کشتها هر سه روز یکبار توسط میکروسکوپ معکوس (Olympus, USA) مورد مطالعه قرار می‌گرفتند و همچنین مایع رویی هر چاهک (جمعاً 100 چاهک) تعویض و جهت اندازه‌گیری میزان VEGF مورد استفاده قرار گرفت.

۱- اندازه‌گیری VEGF جهت اندازه‌گیری میزان VEGF در مایع رویی هر چاهک به روش ساندویچی الایزا از کیت VEGF (RayBio, USA) و دستگاه الایزا (R&D System, USA) استفاده شد. در این آزمایش از چاهک‌های میکروپلیت پوشیده شده توسط آنتی‌بادی ضد VEGF استفاده شد. در ابتدا $200\ \mu\text{l}$ مایع رویی هر چاهک کشت به هر کدام از چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد و به مدت $20\ \text{min}$ در دمای اتاق نگهداری شد تا واکنش اتصال VEGF به آنتی‌بادی اختصاصی آن انجام شود. سپس حفره‌های میکروپلیت با استفاده از بافر شستشو PBS (Sigma, USA) حاوی تووین 20 ، سه بار شستشو گردیدند و به هر حفره $100\ \mu\text{l}$ آنتی‌بادی اختصاصی VEGF نشاندار با پراکسیداز اضافه گردید و به مدت یکساعت در دمای اتاق نگهداری شد و سپس حفره‌های میکروپلیت با استفاده از بافر شستشو، سه بار شستشو گردیدند و به هر حفره به میزان $100\ \mu\text{l}$ محلول سوبسترا حاوی ارتوفنیل دی آمین و H_2O_2 اضافه گردید و در درجه حرارت اتاق به مدت 10 دقیقه قرار داده شد و با بکار بردن Microplate

Reader (Berthold, USA) جذب نوری چاهکها در طول موج $450\ \text{nm}$ خوانده شدند.

رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی: پس از پایان آزمایش، نمونه‌های اندومتريوم کشت داده شده از چاهکها خارج گردیده و در فرمالین بافر 4% تثبیت شدند، پس از انجام مراحل آماده‌سازی بافت و قالب‌گیری، برش‌هایی به ضخامت $5\ \mu\text{m}$ تهیه و با استفاده از آنتی‌بادی Anti-Cox2² (آنتی‌بادی جهت شناسایی رگ‌زایی) (Sigma, USA) با روش ایمونوهیستوشیمی مطابق روش ارائه شده در مطالعه قبلی این گروه (10) مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به درصد تکثیر سلولها و درصد رگ‌زایی، با استفاده از نرم‌افزاری SPSS و مطابق روش ارائه شده در مطالعه قبلی این گروه آزمون آماری χ^2 و داده‌های مربوط به میزان ترشح VEGF، با استفاده از آزمون t داده‌پردازی شدند.

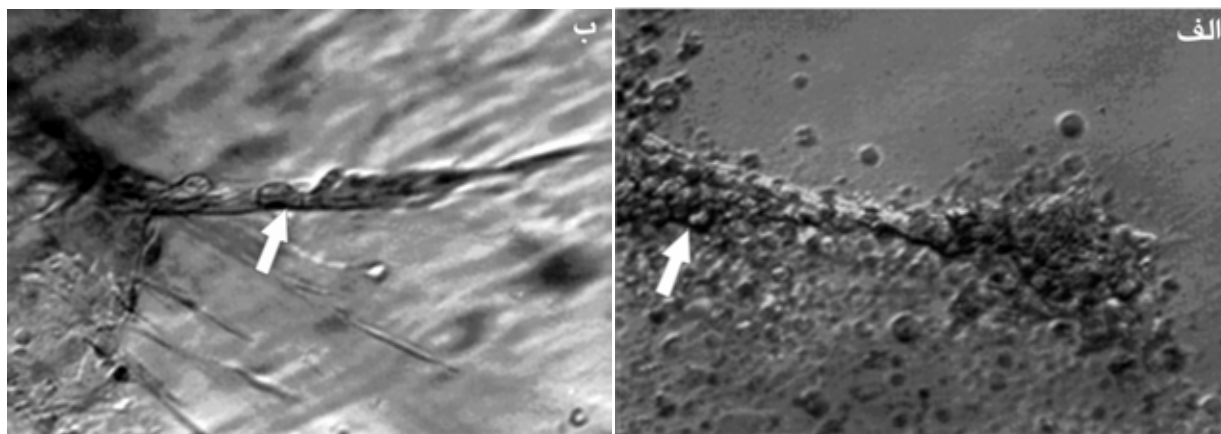
نتایج

در طول هفته اول کشت سه بعدی بافت اندومتريوم در ماتریکس فیبرینی، تهاجم سلول‌های استروما در زمینه فیبرینی مشاهده گردید (شکل ۱- الف). بعد از هفته دوم و سوم، ساختارهای مویرگ مانند که حاکی از پدیده رگ‌زایی بود در چاهک‌های پلیت کشت مشاهده گردید (شکل ۱- ب، ۲- الف و ب).

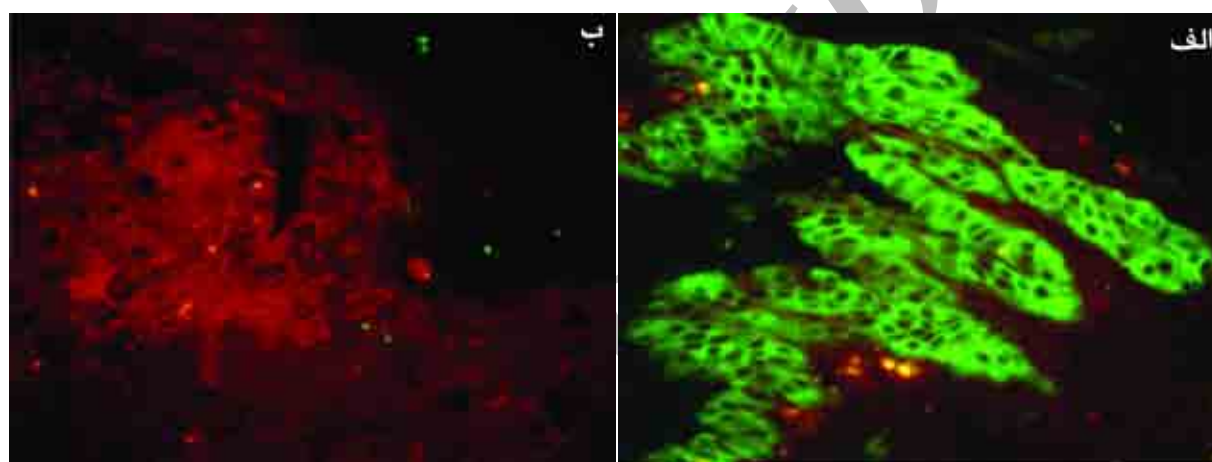
تکثیر سلولها در 91 چاهکها (91%) و رگ‌زایی در 51 چاهکها نشان دهنده تکثیر سلولها مشاهده گردید (56%) (شکل ۲). میزان سطح VEGF در مایع رویی کشت سه بعدی موجود در چاهک‌هایی که رگ‌زایی در آنها دیده شده بود ($492 \pm 3/11$)، افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) را نسبت به چاهک‌هایی فاقد رگ‌زایی ($183 \pm 2/13$) نشان داد.

2- Anti-Cyeloxygenase-2

1- Tween 20



شکل ۱- تصاویر کشت سه بعدی بافت اندومتريوم در ماتریکس فیبرینی، الف: رشد و تکثیر سلول‌های استروما (نوک فلش) در ماتریکس فیبرینی در هفته اول (بزرگنمایی ۱۰×) ب: رشد زوائد مویرگ مانند (نوک فلش) در محیط کشت در هفته دوم و سوم (بزرگنمایی ۱۰×)



شکل ۲- تصاویر مربوط به رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی بوسیله آنتی‌بادی Anti-Cox2، الف: مثبت بودن نتایج ایمنوهیستوشیمی (Positive Immunostaining)، مربوط به گروه‌هایی که رگ‌زایی داشته‌اند (بزرگنمایی ۱۰×)، ب: منفی بودن نتایج ایمنوهیستوشیمی (Negative Immunostaining)، مربوط به گروه‌هایی که رگ‌زایی نداشته‌اند (بزرگنمایی ۱۰×)

بحث

در این تحقیق میزان ترشح VEGF و تکثیر سلول‌های استرومای اندومتريوم و ایجاد رگ‌زایی، در کشت سه بعدی بافت اندومتريوم در زمینه فیبرینی مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه ایجاد و بازسازی بیماری اندومتريوز در خارج از بدن را نیز امکان‌پذیر ساخت. رگ‌زایی وابسته به فاکتورهای آزاد شده از سلول‌ها و چندین فاکتور رشد پپتیدی شامل FGF-a, FGF-b, PD-VEGF و ECCE، تحریک کننده سلول‌های اندوتلیال جهت رگ‌زایی می‌باشند که در این بین VEGF اساسی‌ترین فاکتور رگ‌زایی در اندومتريوم رحم می‌باشد (۱۷).

در مطالعات محققین، اثبات شده است که پاتورژن بیماری اندومتريوز وابسته به شدت رگ‌زایی آن می‌باشد؛ بطوریکه در درجات مختلف بیماری اندومتريوز، غلظت‌های متفاوتی از ترشح VEGF دیده می‌شود (۱۸).

Cosin و همکاران اعلام کردند که بافت‌های اندومتريوم و مایع پریتونال در بیماران اندومتريوز دارای مقدار بالایی از VEGF هستند و VEGF می‌تواند در تکامل و پیشروی اندومتريوز نقش داشته باشد که نتایج تحقیق فوق با نتایج تحقیق حاضر مبتنی بر تاثیر VEGF در رگ‌زایی و در نتیجه پیشروی اندومتريوز، مطابقت دارد (۱۹).

استرومای موجود در بافت‌های اندومتریوم کشت داده شده در چاهک‌هایی که رگزایی در آنها دیده شده، دارای افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به میزان ترشح VEGF از سلول‌های استرومای موجود در بافت‌های اندومتریوم کشت داده شده در چاهک‌هایی بود که رگزایی در آنها دیده نشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر، مبین ایجاد یک مدل اندومتریوز در محیط کشت سه بعدی با ماتریکس فیبرینی در خارج بدن بوده؛ همچنین مبین ازدیاد ترشح VEGF در چاهک‌های کشت همراه با رگزایی می‌باشد؛ به طوریکه می‌توان گفت، یکی از دلایل اصلی ایجاد اندومتریوز، تکثیر سلول‌های استروما و ایجاد رگزایی به دلیل ترشح VEGF است. در نتیجه با مهار VEGF، شاید بتوان بیماری اندومتریوز را کنترل کرد. در ضمن پیشنهاد می‌گردد رابطه بین تکثیر سلولها و میزان ترشح VEGF نیز توسط محققان دیگر مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله نهایت تشکر خود را از سرکار خانم نجمه صدق‌کردار بخاطر ویرایش مقاله اعلام می‌دارند.

گزارشاتی دال بر وجود رابطه بین بیماری اندومتریوز و افزایش سطح سرمی پرولاکتین^۱ ارائه شده است که علت آن می‌تواند ترشح زیاد پرولاکتین و متعاقب آن، ترشح زیاد VEGF و در نتیجه افزایش رگزایی و ایجاد اندومتریوز باشد که نتایج این گزارشات نیز با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۰). در ضمن بررسی رابطه بین میزان تکثیر سلولها و ترشح VEGF یکی از محدودیت‌های این تحقیق محسوب می‌شود که انجام آن می‌تواند در روشن‌تر شدن نتایج کمک کننده باشد. نارسایی‌های ترشح پرولاکتین که منجر به نارسایی‌های ترشح VEGF می‌شود را می‌توان به عنوان یکی از علل ناباروری در بیماران اندومتریوز دانست (۲۱): Ferté و همکاران اظهار نمودند که VEGF باعث رگزایی می‌شود و این رگزایی می‌تواند در بهبود زخمها مؤثر باشد (۲۲)؛ همچنین اسفندیاری و همکاران ثابت کردند علت رگزایی در اندومتریوز، سلول‌های استروما هستند (۲۳). Fujii و همکاران نشان دادند، افرادی که دارای بیماری اندومتریوز هستند، نسبت به افرادی که مبتلا به این بیماری نیستند دارای سطح بالاتری از VEGF در سرم خون، مایع فولیکولی و مایع پریوتونتال می‌باشند (۲۴) که نتایج این مطالعه نیز با نتایج تحقیق حاضر مبتنی بر تأثیر VEGF در رگزایی مطابقت دارد. در تحقیق حاضر، میزان ترشح VEGF از سلول‌های

References

- 1- Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, Melton LJ 3rd. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women. *Fertil Steril*. 1982;38(6):667-72.
- 2- Adamson GD, Nelson HP. Surgical treatment of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997; 24(2):375-409. Review.
- 3- Kettel LM, Hummel WP. Modern medical management of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24(2):361-73. Review.
- 4- Rogers PA, Abberton KM, Susil B. Endothelial cell migratory signal produced by human endometrium during the menstrual cycle. *Hum Reprod*. 1992;7(8): 1061-6.
- 5- Lebovic DI, Bentzien F, Chao VA, Garrett EN, Meng YG, Taylor RN. Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta. *Mol Hum Reprod*. 2000;6(3):269-75.
- 6- Fasciani A, Bocci G, Xu J, Bielecki R, Greenblatt E,

1- Hyperprolactinemia

- Leyland N, et al. Three-dimensional in vitro culture of endometrial explants mimics the early stages of endometriosis. *Fertil Steril*. 2003;80(5):1137-43.
- 7- Halme J, Hammond MG, Hulka JF, Raj SG, Talbert LM. Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis. *Obstet Gynecol*. 1984;64(2):151-4.
- 8- Oral E, Arici A. Pathogenesis of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1997;24(2):219-33. Review.
- 9- Lamb K, Hoffmann RG, Nichols TR. Family trait analysis: a case-control study of 43 women with endometriosis and their best friends. *Am J Obstet Gynecol*. 1986;154(3):596-601.
- 10- Esfandiari N, Ai J, Nazemian Z, Javed MH, Gotlieb L, Casper RF. Expression of glycodelin and cyclooxygenase-2 in human endometrial tissue following three-dimensional culture. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57(1):49-54.
- 11- Esfandiari N, Khazaei M, Ai J, Bielecki R, Gotlieb L, Ryan E, et al. Effect of a statin on an in vitro model of endometriosis. *Fertil Steril*. 2007;87(2):257-62.
- 12- Becker CM, Bartley J, Mechsner S, Ebert AD. [Angiogenesis and endometriose] *Zentralbl Gynakol*. 2004;126(4):252-8. German.
- 13- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18(1):4-25. Review.
- 14- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, Kolch W. Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*. 1994;9(3):963-9.
- 15- Yoo SA, Kwok SK, Kim WU. Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention. *Mediators Inflamm*. 2008;2008:129873. Review.
- 16- Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM, et al. Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: clinical and genetic correlates and association with vascular function. *Eur Heart J*. 2009 Feb 17. [Epub ahead of print].
- 17- Donnez J, Smoes P, Gillerot S, Casanas-Roux F, Nisolle M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in endometriosis. *Hum Reprod*. 1998;13(6):1686-90.
- 18- Rogers PA, Donoghue JF, Walter LM, Girling JE. Endometrial angiogenesis, vascular maturation, and lymphangiogenesis. *Reprod Sci*. 2009;16(2):147-51.
- 19- Cosín R, Gilabert-Estellés J, Ramón LA, España F, Gilabert J, Romeu A, et al. Vascular endothelial growth factor polymorphisms (-460C/T, +405G/C, and 936C/T) and endometriosis: their influence on vascular endothelial growth factor expression. *Fertil Steril*. 2008 Oct 16. [Epub ahead of print].
- 20- Godó G, Sas M, Falkay G. Bromocryptine therapy in luteal insufficiency. *Acta Med Acad Sci Hung*. 1980;37(3):283-8.
- 21- Cunha-Filho JS, Gross JL, Lemos NA, Brandelli A, Castillos M, Passos EP. Hyperprolactinemia and luteal insufficiency in infertile patients with mild and minimal endometriosis. *Horm Metab Res*. 2001;33(4):216-20.
- 22- Ferte C, Massard C, Moldovan C, Desruennes E, Lorient Y, Soria JC. Wound healing delay after central venous access following DCF/VEGF-trap therapy. *Invest New Drugs*. 2009 Feb 17. [Epub ahead of print].
- 23- Esfandiari N, Ai J, Khazaei M, Nazemian Z, Jolly A, Casper RF. Angiogenesis following three-dimensional culture of isolated human endometrial stromal cells. *Int J Fertil Steril*. 2008;2(1):19-22.
- 24- Fujii EY, Nakayama M, Nakagawa A. Concentrations of receptor for advanced glycation end products, VEGF and CML in plasma, follicular fluid, and peritoneal fluid in women with and without endometriosis. *Reprod Sci*. 2008;15(10):1066-74.