

ارزیابی ارتباط بین بیان سوروایوین در آدنوم و کارسینوم فولیکولار تیروئید

دکتر وحید حق پناه^۱، پیمان شوشتری زاده^۱، دکتر آناهیتا لشکری^۱، دکتر رامین حشمت^۲، دکتر باقر لاریجانی^۳
دکتر سید محمد توانگر^۴

^۱ پزشک عمومی، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۲ اپیدمیولوژیست، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۳ استاد مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
^۴ دانشیار بخش پاتولوژی، بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی نویسنده مسئول: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، دکتر سید محمد توانگر
Email: emrc@sina.tums.ac.ir

وصول: ۸۵/۳/۱۸، اصلاح: ۸۵/۱۰/۴، پذیرش: ۸۶/۲/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: سوروایوین یکی از هشت عضو ممانعت کننده از مرگ سلولی است که در سلول‌های سرطانی بروز می‌یابد. در این مطالعه، ارزش بالینی رنگ‌آمیزی سوروایوین برای تفکیک آدنوم از کارسینوم فولیکولار تیروئید مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به روش توصیفی - تحلیلی مقطعی انجام شد. جمعیت آماری نمونه بافت‌های بیماران جراحی شده به علت آدنوم و کارسینوم فولیکولار در بیمارستان شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران بودند که کلیه نمونه‌ها به روش رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی سوروایوین مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان سوروایوین در بیماران با تشخیص کارسینوم فولیکولار در مقایسه با آدنوم فولیکولار بیشتر بود ($P < 0/005$). نسبت شانس در کارسینوم فولیکولار از نظر بیان سوروایوین، $21/375 (139/177 - 3/283)$ CI: $95/0$ گزارش شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می‌دهد که سوروایوین می‌تواند در تفکیک آدنوم از کارسینوم فولیکولار، نقش مؤثری داشته باشد. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزواری، دوره ۱۴/ شماره ۱/ صص ۳۲-۳۷).
واژه‌های کلیدی: سرطان تیروئید؛ نئوپلاسم فولیکولار؛ آپوپتوزیس؛ سوروایوین.

مقدمه

وجود تهاجم کپسولار و عروقی در یافته‌های آسپیراسیون سوزنی (FNA)، آدنوم و کارسینوم فولیکولار تیروئید قابل تفکیک از هم نیستند و معمولاً با نام نئوپلاسم فولیکولار گزارش می‌شوند. در بسیاری از بیماران عمل جراحی با

سرطان تیروئید شایع‌ترین سرطان غدد درون‌ریز است. سرطان فولیکولار تیروئید حدود ۵ الی ۱۰ درصد از سرطان‌های تیروئید را شامل می‌شود (۱). به علت عدم

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA) human surviving بارقت^۱ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳۲ دقیقه بود. ایمونوگلوبین خرگوشی (anti-goat, Dako Corporation, carpinteria, CA, USA) به عنوان دومین آنتی‌بادی با دقت^۱ به کار گرفته شد. پس از دهیدراتاسیون، اسلایدهای موجود توسط میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

از برش‌های آدنوکارسینوم کولون به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید چرا که در رنگ‌آمیزی سوروایوین واکنش مثبت نشان می‌دادند (۵،۱۱). برای تأیید اختصاصی بودن آنتی‌بادی اولیه از اسلایدهای کنترل منفی استفاده شد که این برش‌ها با جابجایی buffered saline و آنتی‌بادی اولیه به دست آمد.

واکنش ایمنی سوروایوین بدون هرگونه آگاهی از نوع بیماری در این بلوک‌ها سنجیده شد. در بررسی ایمنو‌هیستوشیمی، میزان کمی نتایج مثبت سیتوپلاسمیک اندازه‌گیری شد. رنگ‌آمیزی‌های سیتوپلاسمیک به عنوان منفی (کمتر از ۱۰٪)، ۱+ (۵۰٪-۱۰٪) و ۲+ (بیش از ۵۰٪) طبقه‌بندی شدند. نمونه‌هایی که در این رنگ‌آمیزی ۱+ یا ۲+ گزارش شدند، از نظر بروز سوروایوین مثبت تلقی شدند.

برای مقایسه تفاوت بین بروز سوروایوین در آدنوم و کارسینوم فولیکولار، یک جدول ۲×۲ با استفاده از Mantel-Haenszel the fisher exact test رسم شد و $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

تشخیص بافت‌شناسی به عنوان تشخیص استاندارد در نظر گرفته شد. حساسیت بر مبنای وجود فولیکولار کارسینوما در نظر گرفته شد. انواع کارسینوم فولیکولار با بروز سوروایوین به عنوان کل تعداد فولیکولار کارسینوما در نظر گرفته شدند. ویژگی‌های آزمون بر اساس تعداد نمونه‌های فولیکولار آدنوما با عدم وجود سوروایوین در نظر گرفته شد و نشان‌دهنده کل موارد فولیکولار آدنوما

وجود هزینه و عوارض بالا بیشتر از این که جنبه درمانی داشته باشد، جنبه تشخیصی دارد (۲). با توجه به موارد ذکر شده، اکثر ندول‌های تیروئید (۸۰ درصد) که به عنوان نئوپلاسم تیروئید شناسایی می‌شوند، پس از مطالعات هیستولوژیکی خوش‌خیم گزارش می‌شوند (۳) که این مسأله بیشتر به علت شباهت نمای سلولی ضایعات خوش‌خیم و بدخیم تیروئید است (۴).

سوروایوین یکی از هشت عضو ممانعت‌کننده از مرگ سلولی در انسان (Inhibitor of Apoptosis) (IAP) است که در سلول‌های سرطانی انتقالی یافته از بافت‌های طبیعی ظاهر می‌شود (۵،۶). این ماده در سال ۱۹۹۷ با استفاده از روش هیبریدیزاسیون ژنوم انسانی در آزمایشگاه به دست آمد (۷). سوروایوین نقش مهمی در ایجاد عروق جدید ایفا می‌کند. افزایش بروز آن، سلول‌های اندوتلیال را از آپوپتوزیس در شرایط آزمایشگاهی محافظت می‌کند (۸،۹). اگرچه فولیکول‌های سالم بافت تیروئید توانایی بروز سوروایوین را دارند ولی این توانایی در سرطان‌های تیروئید افزایش می‌یابد (۱۰). هدف از این مطالعه این بود که ارزش بالینی سوروایوین را در تفکیک آدنوم از کارسینوم فولیکولار تیروئید شناسایی نماییم.

مواد و روش‌ها

از میان بیماران که در فاصله سال‌های ۲۰۰۳-۱۹۹۰ تحت عمل جراحی تیروئید با تشخیص ضایعه خوش‌خیم یا بدخیم قرار گرفتند، ۳۴ مورد به عنوان آدنوم یا کارسینوم فولیکولار شناسایی شدند. این بیماران از بایگانی بخش پاتولوژی بیمارستان شریعتی در دانشگاه علوم پزشکی تهران جمع‌آوری شدند. رنگ‌آمیزی ایمنو‌هیستوشیمی برای سوروایوین با استفاده از روش غیر مستقیم بیوتین-آویدین-دی‌امینوبنزیدین (DAB) بر روی نمونه‌های پارافینی با قطر ۴mm از بلوک‌های هر نمونه انجام شد.

آنتی‌بادی اولیه شامل polyclonal goat anti

بود.

کارسینوم فولیکولار، هر تِل سل آدنوما و هر تِل سل کارسینوما به ترتیب $۳۸/۳ \pm ۸/۰$ ، $۵۴/۴ \pm ۶/۸$ ، $۳۹/۸ \pm ۶$ و $۳ \pm ۱/۷$ سال گزارش شد (جدول ۱).

تمام نمونه‌های آدنوکارسینوم کولون (کنترل مثبت)، از نظر رنگ آمیزی سورویوین مثبت گزارش شدند. بروز سورویوین در نمونه‌های با تشخیص کارسینوم فولیکولار (۸۱/۸ درصد) در مقایسه با آدنوم فولیکولار (۱۷/۴ درصد) بسیار بیشتر گزارش شد ($P < ۰/۰۰۵$). نسبت شانس در کارسینوم فولیکولار از نظر بروز سورویوین $۲۱/۳۷۵$ بود ($۹۵\% CI: ۳/۲۸۳ - ۱۳۹/۱۷۷$) (درصد).

حساسیت و ویژگی سورویوین برای تفکیک کارسینوم فولیکولار از آدنوم فولیکولار به ترتیب ۸۱/۸

میزان پیش بینی کننده مثبت و منفی توسط تعداد موارد فولیکولار کارسینوما با نتایج مثبت (درصد مواردی- که از نظر بروز سورویوین مثبت بودند) و تعداد موارد فولیکولار آدنوما با نتایج منفی از نظر بروز سورویوین شناسایی شدند. این تحقیق بر اساس قوانین اخلاقی موجود در بیانیه هلسینکی انجام پذیرفت.

یافته‌ها

۴۱ نمونه نئوپلاسم تیروئید در این مطالعه ارزیابی شدند (۲۳ مورد فولیکولار آدنوما، ۱۱ مورد فولیکولار کارسینوما، ۴ مورد هر تِل سل آدنوما و ۳ مورد هر تِل سل کارسینوما). گروه فولیکولار آدنوما، شامل ۸ مرد و ۱۵ زن

جدول ۱: مشخصات بیماران در زمان تشخیص آدنوم فولیکولار، کارسینوم فولیکولار، هر تِل سل آدنوما و هر تِل سل کارسینوما

تشخیص بافت شناسی	تعداد کل	جنس (مرد/زن)		سن	اندازه تومور	تعداد درصد بیماران بر اساس مثبت بودن از نظر بروز سورویوین
		مرد	زن			
آدنوم فولیکولار	۲/۱۵ ± ۰/۹	۸	۱۵	۳۸/۳ ± ۸	۲۳	۴(۱۷/۴)
کارسینوم فولیکولار	۳/۴ ± ۱/۳۲	۳	۸	۶/۸ ± ۵۴/۴	۱۱	۹(۸۱/۸)
هر تِل سل آدنوما	۲/۵ ± ۰/۷۱	۲	۲	۶ ± ۳۹/۸	۴	۴(۱۰۰)
هر تِل سل کارسینوما	۳/۳۳ ± ۰/۵۸	۱	۲	۳ ± ۴۱/۷	۳	۳(۱۰۰)

جدول ۲: توانایی سورویوین در افتراق کارسینوم فولیکولار از آدنوم فولیکولار تیروئید با توجه به مطالعات

گذشته نگر انجام شده بر روی بافت تیروئید

سورویوین جنس و اندازه* تومور	سورویوین یا جنس یا اندازه تومور	سورویوین	گالکتین ۳	گالکتین ۳+CD44v6 (۲۲)
حساسیت (درصد)	۱۰۰	۸۱/۸	۸۲/۳۵	۸۶/۶
ویژگی (درصد)	۳۹/۱۳	۸۲/۶	۹۸/۵۶	۹۴/۷
PPV (درصد)	۴۴	۶۹/۲	۸۲/۳۵	۸۹/۸
NPV (درصد)	۸۲/۱۴	۹۰/۵	۸۹/۶۵	۹۵/۳

*سن ≤ ۴۰ ، اندازه تومور $\leq ۳،۵$ سانتی متر

PPV = ارزش پیش بینی کننده مثبت؛ NPV = ارزش پیش بینی کننده منفی

درصد و $۸۲/۶$ درصد گزارش شد (جدول ۲). با این حال، در صورت در نظر گرفتن سن و سایز ندول به عنوان

و گروه فولیکولار کارسینوما شامل ۳ مرد و ۸ زن بودند. میانگین سنی در زمان تشخیص برای آدنوم فولیکولار،

عامل خطر، میزان حساسیت تا ۱۰۰ درصد بالا می‌رود.

بحث

نتایج این مطالعه بروز بیشتر سورویوین در نمونه‌های کارسینوم فولیکولار را در مقایسه با آدنوم فولیکولار نشان می‌دهد. بیمارانی که مبتلا به کارسینوم فولیکولار تیروئید هستند، در مقایسه با مبتلایان به کارسینوم پاپیلری تیروئید، ریسک بیشتری برای بروز متاستاز دارند (۱۲). روند متاستاز شامل کلیه تغییراتی است که در بروز ژن‌های اختصاصی عامل کدگذاری پروتئین‌های مسئول چسبندگی سلولی، پروتئین‌های مسئول مرگ سلولی و تنظیم‌کنندگان چرخه سلولی انجام می‌گیرد (۱۳).

سورویوین مولکولی است که در کنترل تکثیر سلولی و تنظیم بقای سلول نقش دارد و در سرطان‌های انسانی بیشتر ظاهر می‌شود (۶). در میان مولکول‌های خانواده JAP، سورویوین توانایی تنظیم چرخه سلولی را در زمان میتوز دارد. این ماده در بافت‌های جنینی و بافت‌های سرطانی بروز می‌یابد ولی در بافت نرمال انسانی دیده نمی‌شود (۶).

بروز سورویوین در تومور ریه (۱۴)، پستان (۱۵)، روده بزرگ (۱۶)، شکم (۱۷)، مری (۱۸)، پانکراس (۱۹)، مثانه (۲۰) و نوروپلاستوم (۲۱) دیده شده است. ایتو و همکاران، بروز بیش از دو برابر سورویوین را در بافت‌های کارسینوم فولیکولار در مقایسه با آدنوم فولیکولار گزارش کردند، اگر چه این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (۱۰). حساسیت و ویژگی سورویوین در تفکیک کارسینوم و آدنوم فولیکولار قابل مقایسه با گالکتین ۳ و CD44 V6 است که اخیراً به‌عنوان مارکرهای شناسایی ضایعات بدخیم تیروئید به کار می‌روند (جدول ۲) (۲۴-۲۲).

در برخی مطالعات بیان شده است که بیماران با تشخیص نئوپلاسم تیروئید در دو گروه با میزان خطر

بالای بدخیمی و گروهی که تنها با پیگیری بالینی قابل درمان هستند، طبقه‌بندی می‌شوند (۲۷-۲۵). در این مطالعه با توجه به آنالیزهای آماری و مطالعات قبلی، تظاهرات بالینی مانند سن بالاتر (۴۰ سال به بالا) و اندازه بزرگتر ندول (ضایعات ۳/۵ cm به بالا) به‌عنوان عوامل خطر ابتدایی در نظر گرفته شدند. بروز سورویوین در کارسینوم فولیکولار با حساسیت ۱۰۰ درصد در بیماران مسن و یا دارای تومورهای با اندازه بالا دیده شد. به بیان دیگر، با در نظر گرفتن عدم وجود سورویوین، سن پایین و اندازه کمتر تومور، می‌توان به ویژگی ۱۰۰ درصد دست یافت (جدول ۲).

در این مطالعه، ۱۷/۴ درصد از نمونه‌های آدنوم فولیکولار از نظر بروز سورویوین مثبت بودند. این نمونه‌ها می‌توانند شامل مواردی از تومورهای خوش‌خیم باشند که در نهایت تبدیل به تومور بدخیم می‌شوند. هیچ مدرکی دال بر این که چگونه یک تومور می‌تواند از حالت پیش بدخیم به بدخیم و در نهایت حالت تهاجمی تبدیل شود، وجود ندارد؛ ولی تظاهرات بینابینی در نئوپلاسم‌های فولیکولار می‌تواند تا حدودی این روند را نشان دهد (۲۸). با این حال، برای روشن شدن این نظریه بهتر است که این تئوری بر گروه بیشتری از موارد سرطانی انجام شود.

نئوپلاسم‌های انکوسیتیک یا هرتل سل گروه ناشیایی از تومورهای اپی‌تلیال تیروئید هستند. اگر چه در گذشته هرتل سل کارسینوما به‌عنوان کارسینوم فولیکولار در نظر گرفته می‌شد، ولی اکنون دارای ناهای متفاوت پاتولوژیک هستند (۲۹). در این مطالعه، هرتل سل را یک گروه جداگانه در نظر گرفتیم. تمام موارد هرتل سل از نظر بروز سورویوین مثبت بودند ولی از آنجایی که تعداد نمونه‌ها ناکافی بود، ما نتوانستیم این گروه را به‌درستی ارزیابی و آنالیز نماییم.

تعداد کل نمونه‌ها در این بررسی ۱۳ ساله ناکافی بودند. استفاده از تعداد نمونه‌های بیشتر همچنین

متغیرهای بالینی (سن، جنس و اندازه ندول تیروئید) انجام شود، می‌تواند یک روش تشخیصی دقیق برای تشخیص کارسینوم فولیکولار تیروئید مطرح شود. این موارد می‌توانند باعث کاهش تعداد موارد جراحی، افزایش میزان برداشت بافت‌های بدخیم و کاهش هزینه درمانی شوند.

اندازه‌گیری mRNA سوروایوین در نمونه‌های FNA می‌تواند روشی مفید در تفکیک آدنوم از کارسینوم فولیکولار باشد. همچنین ما معتقدیم که ارزش تشخیصی سوروایوین سرم در سرطان تیروئید باید مورد ارزیابی مجدد قرار گیرد.

اگر این نتایج در یک مطالعه چند کانونی شامل مجموع سوروایوین، CD44V6 و گالکتین ۳ همزمان با

Reference

- Mackenzie EJ, Mortimer RH. Thyroid nodules and thyroid cancer. *Med J Aust* 2004; 180(5): 242-7.
- Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, et al. Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer*. 2000; 90(6): 335-41.
- Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*. 2002; 26(1): 41-4.
- Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta Cytol*. 1987; 31(5): 587-90.
- Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 2003; 197(1): 8-29.
- Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 2001; 7(12): 542-7.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997; 3(8): 917-21.
- Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet*. 1999; 23(4): 387-8.
- O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol*. 2000; 156(2): 393-8.
- Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Nakano K, Miya A, Kobayashi K, et al. Survivin expression is significantly linked to the dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 2003; 10(5): 1337-40.
- Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, Survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46(5): 645-50.
- Lin JD, Huang MJ, Juang JH, Chao TC, Huang BY, Chen KW, et al. Factors related to the survival of papillary and follicular thyroid carcinoma patients with distant metastases. *Thyroid*. 1999; 9(12): 1227-35.
- Chen KT, Lin JD, Chao TC, Hsueh C, Chang CA, Weng HF, et al. Identifying differentially expressed genes associated with metastasis of follicular thyroid cancer by cDNA expression array. *Thyroid*. 2001; 11(1): 41-6.
- Monzó M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sánchez JJ, Maestre J, et al. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol*. 1999; 17(7): 2100-4.
- Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(1): 127-34.
- Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998; 58(22): 5071-4.
- Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res*. 1998; 58(9): 1808-12.

18. Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, et al. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer*. 2001; 95(2): 92-5.
19. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer*. 2001; 92(2): 271-8.
20. Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med*. 1999; 341(6): 452-3.
21. Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet*. 1998; 351(9106): 882-3.
22. Gasbarri A, Martegani MP, Del Prete F, Lucante T, Natali PG, Bartolazzi A. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol*. 1999; 17(11): 3494-502.
23. Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, et al. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res*. 1998; 58(14): 3015-20.
24. Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology*. 2002; 40(1): 80-7.
25. Schlinkert RT, van Heerden JA, Goellner JR, Gharib H, Smith SL, Rosales RF, et al. Factors that predict malignant thyroid lesions when fine-needle aspiration is "suspicious for follicular neoplasm". *Mayo Clin Proc*. 1997; 72(10): 913-6.
26. Tuttle RM, Lemar H, Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid*. 1998; 8(5): 377-83.
27. Bartolazzi A. Improving accuracy of cytology for nodular thyroid lesions. *Lancet*. 2000; 355(9216): 1661-2.
28. Segev DL, Umbricht C, Zeiger MA. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol*. 2003; 12(2): 69-90.
29. Stojadinovic A, Ghossein RA, Hoos A, Urist MJ, Spiro RH, Shah JP, et al. Hurthle cell carcinoma: a critical histopathologic appraisal. *J Clin Oncol*. 2001; 19(10): 2616-25.