

The Role of Strogen Receptor β Expression and its Relationship with Tumor Characteristics in Patients with Breast Cancer

Mohammad Zangoeei¹

Mitra Rafiee²

Atena Mansouri³

¹ Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

² Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³ Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

(Received January 6, 2024; Accepted May 13, 2024)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer is the 1st most common cancer in the female population and the third leading cause of cancer mortality in Ladies. Given the importance of early detection of cancer, it is necessary to find biomarkers related to this disease that are essential for the prognosis and early diagnosis of breast cancer. The estrogen receptor gene for beta, whose full name is Estrogen Receptor- β (ESR β). Our main aim in this study was to investigate the expression changes of this gene in cancer tissue tumor samples compared to normal tissue samples to obtain a biomarker to predict the risk of cancer.

Materials and methods: In this research, in 2023 samples were obtained from 30 patients diagnosed with breast cancer who underwent surgery at Omid Hospital in Mashhad. Both tumor tissue and adjacent healthy tissue were collected from each patient. The diagnosis of breast cancer was confirmed by a specialist doctor, and none of the patients had received any prior treatment such as chemotherapy or radiation therapy. Tissue samples were collected immediately after surgery and stored at -70°C. RNA extraction and synthesis were performed, followed by analysis of the expression of the ESR gene along with the GAPDH gene as an internal control, using real-time PCR.

Results: In this study, 30 cancer patients were examined, with ages ranging from 32 to 62 years old and a mean age of 47.5 ± 9.38 . Among them, one person had tumor grade 1, 16 had grade 2 tumors, and 8 had grade 3 tumors. Metastasis was observed in 11 patients (36.7%), while 19 patients (63.3%) had no metastasis. Regarding tumor size distribution, 5 patients (16.7%) had tumors smaller than 1 cm, and 25 patients (83.3%) had tumors sized between 1 and 2 cm. The study focused on changes in the expression of the ESR β gene in both tumor and adjacent healthy tissues of breast cancer patients. It was found that the gene expression was higher in tumor samples compared to the adjacent healthy tissues. Using SPSS software, the analysis revealed a significant relationship between gene expression intensity and tumor grade across all three groups. Additionally, a significant difference was observed between patients with and without tumor metastasis.

Conclusion: Overall, the findings of this study indicate a significant correlation between gene expression intensity and tumor grade across all three groups. Moreover, there is a significant distinction between patients with and without tumor metastasis. Notably, a considerable expression difference was observed between healthy and tumor samples. Hence, this gene could serve as a potential biomarker for cancer diagnosis.

Keywords: Breast cancer, Estrogen Receptor- β , Biomarker, Gene expression, Real-Time PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (233): 213-218 (Persian).

Corresponding Author: Atena Mansouri - Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran. (E-mail: mansouri_atena@yahoo.com)

نقش بیان گیرنده استروژن β و ارتباط آن با ویژگی‌های تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان

محمد زنگویی^۱

میترا رفیعی^۲

آتنا منصوری^۳

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان رایج‌ترین سرطان در جمعیت زنان و سومین عامل مرگ و میر مربوط به سرطان بانوان است. با توجه به اهمیت تشخیص زود هنگام سرطان، لزوم یافتن بیومارکرهای مرتبط با این بیماری به منظور پیش‌آگهی و تشخیص زود هنگام سرطان پستان امری ضروریست. ژن گیرنده استروژن β که نام کامل آن Estrogen Receptor- β می‌باشد. این مطالعه با هدف بررسی تغییرات بیانی گیرنده استروژن β در نمونه‌های توموری بافت سرطان در مقایسه با نمونه بافت نرمال به منظور دستیابی به یک بیومارکر برای پیش‌آگهی احتمال ابتلا به سرطان، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی، در سال ۱۴۰۲ بر روی ۳۰ بافت توموری و سالم اطراف تومور از بیماران مبتلا به سرطان سینه که در بیمارستان امید مشهد تحت عمل جراحی قرار گرفتند و توسط پزشک متخصص تایید شده بودند و هنوز هیچ درمانی شامل درمان‌های شیمی درمانی و پرتو درمانی برای آن‌ها انجام نشده بود؛ انجام گرفت. نمونه‌ها پس از عمل جراحی از بیماران مبتلا به سرطان پستان جمع‌آوری گردید و بلافاصله به فریزر -70°C منتقل شد. پس از استخراج RNA و سنتز، cDNA با روش Real-Time PCR بیان ژن ESR و ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌دار کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه تعداد ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه کم‌ترین سن بیماران ۳۲ سال و بیش‌ترین بیماران سن ۶۲ سال بوده است و میانگین سن شرکت‌کنندگان نیز $47/5 \pm 9/38$ بود ۶ نفر دارای گرید توموری یک، ۱۶ نفر دارای گرید توموری دو و ۸ نفر دارای گرید توموری سه بوده‌اند. توزیع متاستاز را در بیماران ۱۱ نفر معادل $36/7$ درصد از بیماران دارای متاستاز و ۱۹ نفر معادل $63/3$ درصد بیماران فاقد متاستاز بوده‌اند. توزیع اندازه تومور، بیمار دارای اندازه تومور کم‌تر از ۱ سانتی‌متر یعنی معادل $16/7$ درصد و ۲۵ بیمار دارای اندازه تومور بین ۱ تا ۲ سانتی‌متر یعنی معادل $83/3$ درصد داشتند. تغییرات در بیان ژن ESR β در بافت تومور و سالم مجاور تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان بررسی شد. بیان افزایشی این ژن در نمونه‌های توموری نسبت به بافت سالم مجاور تومور مشاهده شد. هم‌چنین تحلیل این نتایج با کمک نرم‌افزار SPSS نشان داد که شدت بیان ژن با درجه تومور ارتباط معنی‌داری بین هر سه گروه وجود دارد. هم‌چنین نتایج نشان داد که بین دو گروه از بیماران براساس وجود یا عدم وجود متاستاز تومورشان اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

استنتاج: به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که شدت بیان ژن با درجه تومور ارتباط معنی‌داری بین هر سه گروه وجود دارد. هم‌چنین نتایج نشان داد که بین دو گروه از بیماران براساس وجود یا عدم وجود متاستاز تومورشان اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تغییر بیان معنی‌داری بین نمونه‌های سالم و تومور مشاهده شد. از این رو این ژن می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر برای تشخیص سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، استروژن رسپتور بتا، بیومارکر، بیان ژن، Real-Time PCR

E-mail: mansouri_atena@yahoo.com

مؤلف مسئول: آتنا منصوری - بیرجند: دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

۱. استادیار، گروه بوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۲. استادیار، گروه ایمنونولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۲/۲۴

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بیماری زنان در سراسر جهان می‌باشد و براساس اطلاعات مرکز بین‌المللی تحقیقات سرطان، سرطان پستان دومین علت مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (۲،۱).

سرطان معمولاً با پیشرفت نابه جای چرخه سلولی و آپوپتوز ناقص، به دلیل فعال شدن پروتئوآنکوژن‌ها و غیر فعال شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور ایجاد می‌شود (۴،۳). شیوع سرطان پستان در میان زنان ایالات متحده آمریکا به‌عنوان دومین علت شایع مرگ و میر توسط سرطان بیان شده است (۵). بافت‌شناسی سرطان سینه براساس طبقه‌بندی TNM توسط کمیته سرطان آمریکا و اتحادیه بین‌المللی کنترل سرطان می‌باشد. سیستم ایمنی ذاتی نقش مهمی را در گسترش سرطان‌ها ایفا می‌کند و در سالیان اخیر شواهد جمع‌آوری شده، رابطه همسویی بین سرطان سینه و سیستم ایمنی بیان داشته است (۶). تقریباً ۷۰ درصد از سرطان‌های پستان گیرنده‌های استروژنی را بیان می‌کنند که به‌وسیله استروژن بیان می‌شود. در حالی که تخمدان‌ها منبع اصلی استروژن در زنان پیش از منوپوز هستند، اکثر سرطان‌های پستان به دنبال منوپوز تشخیص داده می‌شوند که سطح سیستمیک این هورمون کاهش یافته است. و استروژن از پیش‌سازهای آندروژنی تولید می‌شود (۷). استروژن نقش مهمی را پیشرفت و متاستاز کانسر پستان وابسته به هورمون بازی می‌کند. اثر استروژن عمدتاً از طریق گیرنده استروژن (ERs) که دو نوع آلفا ($ER.\alpha$) و بتای ($ER.\beta$) آن شناخته شده، انجام می‌گردد (۸). استروژن رسپتور آلفا در سطح تقریباً ۱۰ درصد از سلول‌های اپی‌تلیال سلول‌های پستان نرمال بیان می‌شود. اما در سرطان پستان ۵۰-۸۰ درصد افزایش بیان نشان می‌دهد (۹،۱۰). گیرنده استروژن نوع بتا ($ER.\beta$) از نظر ساختمانی شبیه به دومین‌های نوع $ER.\alpha$ می‌باشد، اما عملکرد آن متفاوت است به‌طوری‌که نقش $ER.\beta$ در سرطان پستان ناشناخته باقی مانده است و

در حال حاضر از $ER.\beta$ در تشخیص یا درمان این سرطان استفاده نمی‌شود (۱۱). تاکنون مطالعات کمی برای بررسی بیان $ER.\beta$ و پیشرفت سرطان پستان و متاستاز و این که سطوح بالای $ER.\beta$ با پروگنوز ضعیف بیماری ارتباط دارد، انجام شده است (۱۲). مطالعات زیادی نشان داده است که $ER.\beta$ یک فعالیت ضد انکوژنیک در سرطان پستان دارد (۱۳). بنابراین $ER.\beta$ ممکن است یک هدف درمانی بالقوه در سرطان پستان باشد. با این وجود مکانیسم‌های مولکولی و نقش احتمال مهارکنندگی آن ناشناخته باقی مانده است و نیاز به بررسی‌های بیش‌تر مولکولی وجود دارد. این تحقیق با هدف بررسی شدت بیان ژن $ER.\beta$ در بافت بیماران مبتلا به سرطان پستان و مقایسه با گروه کنترل، شدت بیان را این ژن را بر اساس معیارهای پاتولوژیک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه مقطعی (۱۴۰۲)، ۳۰ بافت توموری و سالم اطراف تومور از بیماران مبتلا به سرطان سینه که در بیمارستان امید مشهد تحت عمل جراحی قرار گرفتند و توسط پزشک متخصص تایید شده بودند و هنوز هیچ درمانی شامل درمان‌های شیمی‌درمانی و پرتو درمانی برای آن‌ها انجام نشده بود، مورد بررسی قرار گرفت (جدول شماره ۱). این مطالعه در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و مطابق با قوانین کمیته اخلاق این مرکز (با کد IR.BUMS.REC.1402.417) تصویب و انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله داخل RNA Later قرار گرفته و در فریزر ۰۸۰ نگه‌داری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

در این آزمایش استخراج RNA با استفاده از تریزول انجام شده است. محلول تریزول محلول شیمیایی است

که ماده اصلی آن گوانیدین تیوسیانات می باشد و برای استخراج RNA از انواع نمونه ها استفاده شد. نمونه هایی برای Real Time PCR انتخاب شد که RNA آن از کیفیت مناسب برخوردار بود. ۱ میکرولیتر از RNA برداشته و جذب آن در طول موج های 260/280 نانومتر به خوانده شد و نمونه هایی با جذب ۱/۵ تا ۲ انتخاب شدند. برای سنتز cDNA از تمام نمونه ها غلظت یکسانی از mRNA برداشته شد و با استفاده از کیت سنتز cDNA پارس طوس از روی آن نسخه برداری معکوس انجام گرفت.

طراحی پرایمر

پرایمرها توسط نرم افزار AlleleID version ۷/۵ طراحی گردید (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: مشخصات بیماران

بیماران	فاکتور	سن
تعداد (درصد)		
۴۷/۵۰ ± ۹/۳۸		
۶ (۲۰)	یک	گراید تومور
۱۶ (۵۳/۳)	دو	
۸ (۲۶/۷)	سه	
۱۱ (۳۶/۷)	متاستاز دارد	توزیع متاستاز
۱۹ (۶۳/۳)	متاستاز ندارد	
۵ (۱۶/۷)	کم تر از ۱ سانتی متر	اندازه تومور
۲۵ (۸۳/۳)	بیش تر از ۱ سانتی متر	

جدول شماره ۲: توالی پرایمرها

Amplicon Size(bp)	Sequence (5' → 3')	ژن ها
۱۲۰bp	F: CTCATCCTGCTCCTGGTCT R: AATCCCTTGAATGTTGCTG	Estrogen Receptor- β
۱۰۱bp	F: GGAAGGTGAAGGTCGGAGT R: GTCATTGATGGCAACAATA	GAPDH

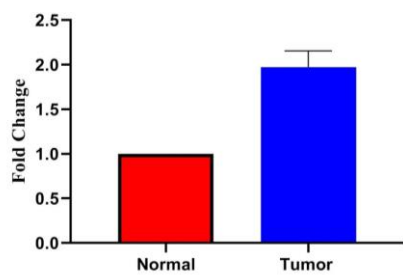
واکنش Real Time PCR

برای اندازه گیری بیان ژن ER- β تکثیر ژن توسط واکنش Real time PCR با استفاده از کیت Syber Green شرکت پارس طوس انجام شد. تعیین کمیت نسبی به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ سایبر گرین انجام گرفت با داشتن Ct هر ژن و هم چنین Ct ژن نرمالایز که در این

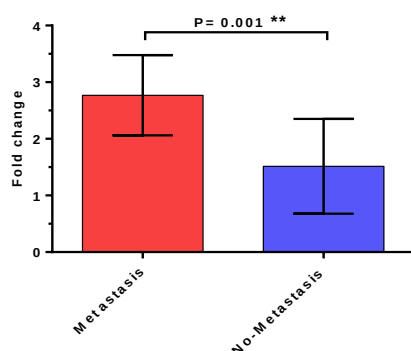
آزمایش از GAPDH استفاده شده است، می توان تغییرات fold change را طبق فرمول محاسبه کرد. برای نمونه های نرمال میانگین از ΔCt منظور گردیده و fold change هر کدام از نمونه های توموری نسبت به میانگین نمونه های نرمال محاسبه شد (۱۴).

یافته ها و بحث

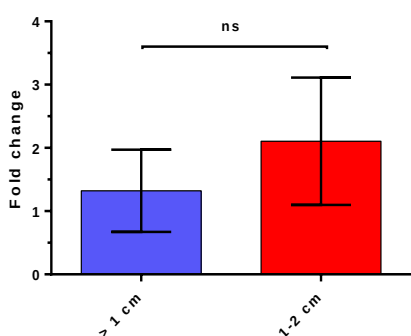
در این مطالعه تعداد ۳۰ بیمار مبتلا به سرطان مورد بررسی قرار گرفتند، جدول شماره ۱، بر اساس اطلاعات بیماران تنظیم شده است. در این تحقیق بررسی بیان رسپتور استروژن بتا در زنان مبتلا به سرطان پستان انجام گرفت. نتایج این بخش از مطالعه حاصل با نتایج Anestis و همکاران همخوانی داشت. آن ها در ۲۰۱۹ از دانشگاه Kapodistrian یونان در تحقیقی با عنوان "حساسیت گیرنده های استروژن بتا به enzalutamide در سرطان پستان با گیرنده های مثبت و منفی" عنوان کردند که رسپتور استروژن بتا به عنوان یک فاکتور جدید و بیومارکر پیشگویی کننده در بیماران مبتلا به سرطان پستان با نقشی که مهار کردن تکثیر سلول های سرطانی به عهده دارد، مطرح است. هم چنین آن ها گزارش کردند که در شرایط Invitro، گیرنده رسپتور استروژن بتا موجب مهار تکثیر سلول های سرطان پستان از طریق سرکوب نسخه برداری ژنی می شود، به علاوه نتایج آن ها نشان داد که یک مکانیسم جدید به وسیله رسپتور استروژن بتا با یک اثر انکوساپرسیو اعمال می شود (۱۵). نتایج آنالیز آماری نشان داد فرضیه نرمال بودن (آزمون شاپیروویکس) بیان ژن رسپتور استروژن بتا قبول گردید ($P > 0/05$). اختلاف معنی داری (آزمون استیودنت) بین دو گروه از نظر شدت بیان ژن رسپتور استروژن بتا مشاهده نمی شود ($P = 0/968$). گزارشاتی وجود دارد که نشان می دهند تقریباً ۷ درصد از تومورهای پستان در زنان در سن زیر ۴۰ سال تشخیص داده می شوند. با تشخیص زود هنگام بیماری و اقدام به درمان زود هنگام بیماری در زنان جوانتر بقای بیماران بیش تر



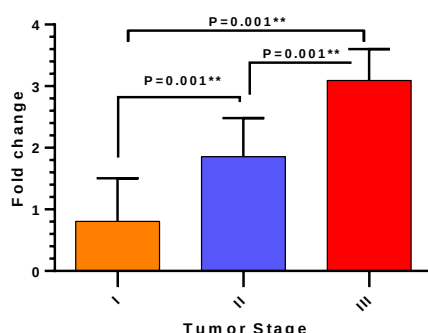
نمودار شماره ۱: بیان ژن استروژن بتا در بافت سالم نسبت به بافت نرمال



نمودار شماره ۲: ارتباط متاستاز با شدت بیان ژن در بیماران مبتلا به سرطان



نمودار شماره ۳: ارتباط اندازه تومور با شدت بیان ژن در بیماران مبتلا به سرطان



نمودار شماره ۴: ارتباط گرید تومور با شدت بیان ژن در بیماران مبتلا به سرطان

خواهد بود. بنابراین یکی از معیارهای مهم در بررسی‌های ژنتیکی ارزیابی بیان ژن در ارتباط با سن بیماران است. همان‌طور که نمودار شماره ۱، نشان می‌دهد میزان بیان ژن استروژن بتا در بافت توموری نسبت به بافت نرمال به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته که از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($P=0/0001$). همچنین Tan و همکاران از دانشگاه Sun Yat-Sen چین در سال ۲۰۱۶ در یک مطالعه سیستماتیک مروری با عنوان "گیرنده استروژن بتا به‌عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی دهنده در سرطان پستان" عنوان کرد نقش گیرنده رسپتور استروژن بتا در مراحل اولیه سرطان پستان ناشناخته است (۱۶).

اختلاف معنی‌داری (آزمون استیودنت) بین دو گروه از نظر شدت بیان ژن $ER.\beta$ و متاستاز مشاهده می‌شود ($P=0/0001$ **) (نمودار شماره ۲).

اختلاف معنی‌داری (آزمون استیودنت) بین دو گروه از نظر شدت بیان ژن $ER.\beta$ و اندازه تومور مشاهده نمی‌شود ($P=0/108$) (نمودار شماره ۳).

اختلاف معنی‌داری (آنالیز واریانس) بین سه گروه از نظر شدت بیان ژن $ER.\beta$ و گرید تومور مشاهده می‌شود ($P=0/0001$ **) (نمودار شماره ۴).

جهت بررسی کلی ارتباط بین متغیرها با بیان ژن $ER.\beta$ از یک مدل خطی استفاده شده است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که متاستاز و گرید تومور ارتباط معنی‌داری با شدت بیان ژن $ER.\beta$ دارد ($P<0/05$ *). به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که شدت بیان ژن با درجه تومور ارتباط معنی‌داری بین هر سه گروه وجود دارد. همچنین نتایج نشان داد که بین دو گروه از بیماران براساس وجود یا عدم وجود متاستاز تومورشان اختلاف معنی‌داری وجود دارد. تغییر بیان معنی‌داری بین نمونه‌های سالم و تومور مشاهده شد. از این رو این ژن می‌تواند به‌عنوان یک بیومارکر برای تشخیص سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359-E386.
2. Ye F, Dewanjee S, Li Y, Jha NK, Chen Z-S, Kumar A, et al. Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer. *Mol Cancer* 2023; 22(1): 105.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
4. Seksenyan A, Kadavallore A, Walts AE, de la Torre B, Berel D, Strom SP, et al. TOX3 is expressed in mammary ER+ epithelial cells and regulates ER target genes in luminal breast cancer. *BMC Cancer* 2015; 15(1): 22.
5. Tabariès S, Ouellet V, Hsu BE, Annis MG, Rose AA, Meunier L, et al. Granulocytic immune infiltrates are essential for the efficient formation of breast cancer liver metastases. *Breast Cancer Res* 2015; 17(1): 45.
6. Hamidinia M, Boroujerdnia MG, Talaiezadeh A, Solgi G, Roshani R, Iranprast S, et al. Increased P-35, EBI3 transcripts and other treg markers in peripheral blood mononuclear cells of breast cancer patients with different clinical stages. *Adv Pharm Bull* 2015; 5(2): 261-267.
7. Amanatullah DF, Tamaresis JS, Chu P, Bachmann MH, Hoang NM, Collyar D, et al. Local estrogen axis in the human bone microenvironment regulates estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2017; 19(1): 121.
8. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 2007; 87(3): 905-931.
9. Huang B, Omoto Y, Iwase H, Yamashita H, Toyama T, Coombes RC, et al. Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(5): 1933-1938.
10. Kiliti AJ, Sharif GM, Martin MB, Wellstein A, Riegel AT. AIB1/SRC-3/NCOA3 function in estrogen receptor alpha positive breast cancer. *Front Endocrinol* 2023; 14: 120218.
11. Song P, Li Y, Dong Y, Liang Y, Qu H, Qi D, et al. Estrogen receptor β inhibits breast cancer cells migration and invasion through CLDN6-mediated autophagy. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38(1): 354.
12. Piperigkou Z, Bouris P, Onisto M, Franchi M, Kletsas D, Theocharis AD, et al. Estrogen receptor beta modulates breast cancer cells functional properties, signaling and expression of matrix molecules. *Matrix Biol* 2016; 56: 4-23.
13. Shen K, Yu H, Xie B, Meng Q, Dong C, Shen K, et al. Anticancer or carcinogenic? The role of estrogen receptor β in breast cancer progression. *Pharmacol Ther* 2023; 242: 108350.
14. Mahmoudian RA, Gharai ML, Abbaszadegan MR, Alasti A, Forghanifard MM, Mansouri A, et al. Crosstalk between MMP-13, CD44, and TWIST1 and its role in regulation of EMT in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Cell Biochem* 2021; 476: 2465-2478.
15. Anestis A, Sarantis P, Theocharis S, Zoi I, Tryfonopoulos D, Korogiannos A, et al. Estrogen receptor beta increases sensitivity to enzalutamide in androgen receptor-positive triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145(5): 1221-1233.
16. Tan W, Li Q, Chen K, Su F, Song E, Gong C. Estrogen receptor beta as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2016; 7(9): 10373-10385.