

## بررسی وضعیت گیرنده آزاد پرولاکتین در سرطان پستان

مجید سیرتی ثابت\* دکتر فاطمه کرمی تهرانی\*\* دکتر محمد تقی خانی\*\*\* دکتر مرتضی عطری\*\*\*\*

### Free prolactin receptor status in breast cancer

M. Sirati Sabet F. Karami Tehrani M. Taghikhani M. Atri

#### Abstract

**Background :** Prolactin simulates the development and differentiation of breast cells. This hormone is mediated by its binding to the specific membrane receptor.

**Objective :** To evaluate the free prolactin receptor (PRO-R) status in malignant tumors of the breast.

**Methods :** Free PRO-R was estimated in the membrane of 40 breast cancer tumors by ligand binding assay.

**Findings :** The results indicated that 45% of tumors had specific binding greater than 1% of radioactivity which were defined to be positive for PRO-R. Grade II and III tumors had 54% and 40% PRO-R respectively. 40% of the patients with lymph node involvement and 64% without lymph node involvement were observed to be positive for PRO-R. 40% of premenopauses and 50% of postmenopauses had PRO-R<sup>+</sup>.

**Conclusion :** Some breast cancer tumors have lymph node involvement.

**Keywords :** Prolactin Receptor , Breast Cancer

#### چکیده

**زمینه :** هورمون پرولاکتین سبب رشد و تمایز سلول‌های پستان می‌شود. اثرات این هورمون از طریق گیرنده غشایی بر سلول هدف آن اعمال می‌گردد.

**هدف :** در این مطالعه گیرنده آزاد پرولاکتین در تومورهای سرطان پستان بررسی گردید.

**مواد و روش‌ها :** میزان گیرنده آزاد پرولاکتین در غشاء ۴۰ نمونه تومور سرطان پستان با استفاده از روش اتصال لیگاند ارزیابی گردید.

**یافته‌ها :** در ۴۵٪ تومورهای مورد بررسی اتصال ویژه بیش از ۱٪ پرولاکتین رادیواکتیو مشاهده شد که حاکی از وجود گیرنده پرولاکتین در غشاء این نمونه‌ها بود. ۵۴٪ نمونه‌های درجه دو و ۴۰٪ نمونه‌های درجه سه دارای گیرنده آزاد پرولاکتین بودند. ۴۰٪ نمونه‌های بیماران دچار درگیری گره‌های لنفاوی و ۶۴٪ نمونه‌های بیماران فاقد درگیری گره‌های لنفاوی، گیرنده آزاد پرولاکتین داشتند. میزان گیرنده در قبل از سن یائسگی ۴۰٪ و در بعد از سن یائسگی ۵۰٪ بود.

**نتیجه‌گیری :** بعضی از تومورهای بدخیم پستان دارای گیرنده پرولاکتین هستند.

**کلیدواژه‌ها :** گیرنده پرولاکتین - سرطان پستان

\* دانشجوی دکترای بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس و مربی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

\*\* استادیار دانشگاه تربیت مدرس

\*\*\* دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

\*\*\*\* استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

### □ مقدمه :

پرولاکتین هورمونی گلیکوپروتئینی است که از نظر ساختمانی شباهت زیادی به هورمون رشد و لاکتوژن جفتی دارد. (۳) مشخص شده است که این هورمون علاوه بر سلول‌های لاکتوتروپ هیپوفیز قدامی، به وسیله سلول‌های دیگری از جمله بافت پستان نیز ترشح می‌شود (۲ و ۸ و ۲۱) که انعکاسی از نقش اتوکراینی یا پاراکراینی این هورمون علاوه بر نقش اندوکراینی آن است. (۸ و ۹) اثرات هورمون پرولاکتین بر بافت پستان انسان عبارت است از تنظیم رشد و تمایز اپیتلیوم مجرای، تکثیر و تمایز واحدهای لوبولار با همکاری هورمون پروژسترون و شروع و تثبیت شیردهی. (۲۵ و ۱۴)

گیرنده هورمون پرولاکتین یکی از اعضای خانواده گیرنده سایتوکاینی طبقه اول است که ژن کدکننده آن روی کروموزوم پنج قرار دارد. (۳) در بعضی از گونه‌ها چندین نوع گیرنده غشایی پرولاکتین مشاهده شده است که به دلیل پیرایش‌های متفاوت نسخه اولیه ترجمه شده ایجاد می‌گردند. این گیرنده‌های ایزوفرم در طول اجزای قسمت سیتوپلاسمی تفاوت دارند و با توجه به اندازه به نوع کوتاه، متوسط و طویل اطلاق می‌گردند. (۷ و ۸ و ۱۰)

اتصال پرولاکتین به گیرنده سبب دیمر شدن گیرنده شده که به دنبال آن فعال شدن پروتئین *JAK2* مشاهده می‌شود که دارای خاصیت تیروزین کینازی است. پروتئین‌های *STAT5a* و *STAT5b* پروتئین‌های دیگری هستند که در ادامه مسیر، نقش مهمی را در مسیر انتقال پیام پرولاکتین ایفا می‌نمایند. (۱۱)

مدت زیادی است که وابستگی رشد بعضی از

تومورهای سرطان پستان به هورمون‌های استروژنی مشخص شده است. (۱۷ و ۱۹) مطالعات اخیر نقش فاکتورهای دیگری از جمله هورمون‌های پپتیدی را در رشد سلول‌های سرطان پستان مطرح می‌نماید. (۱۲) پرولاکتین یکی از هورمون‌هایی است که با در نظر گرفتن نقش فیزیولوژیک آن روی بافت پستان و حساسیت پستان به آن مورد توجه قرار گرفت. (۱۳ و ۱۵ و ۲۰) پرولاکتین در اتیولوژی سرطان پستان در جوندگان که به طور خود به خود یا با دارو القا شده بود، مؤثر بود و در درمان این عارضه، عوامل ضد پرولاکتینی پاسخ‌های قابل قبولی ایجاد نمودند. (۲۷ و ۳۰) با شناسایی نقش پرولاکتین در سرطان پستان جوندگان به نظر می‌رسد که عملکرد این هورمون در سرطان پستان انسان نیز حائز اهمیت باشد. (۲۹) مطالعات متعددی روی سطح پلاسمایی پرولاکتین در سرطان پستان انجام گردیده است. اما ارتباط اتیولوژیک بین میزان پرولاکتین سرم و تومورزایی پستان در انسان هنوز به درستی مشخص نشده و اهداف درمانی همچون برداشت هیپوفیز یا استفاده از داروی بروموکریپتین مفید نبوده است. (۶) با توجه به این که عوامل متعددی در تنظیم ترشح پرولاکتین دخیل هستند (۲ و ۱۵ و ۲۸) سطح پلاسمایی نمی‌تواند شاخص خوبی جهت ارزیابی نقش این هورمون در سرطان پستان انسان باشد. همچنین مشخص شده است که علاوه بر سلول‌های لاکتوتروپ هیپوفیز قدامی، پرولاکتین از بافت‌های دیگری از جمله پستان ترشح می‌گردد که این سنتر موضعی می‌تواند توجه‌کننده ناکامی روش‌های هورمون درمانی

همگن گردید. مخلوط همگن حاصل با قدرت ۱۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی حاصل با قدرت ۱۰۰۰۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل، که شامل غشاء پلاسمایی است، در بافر  $TM$  (۲۵ میلی مولار تریس-HCl، ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم و ۰/۱ درصد آلبومین سرم گاوی با  $PH=7/4$ ) همگن شد و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. (۲۲)

غلظت پروتئین در نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد و بهره‌گیری از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد تعیین شد. (۵)

برای تهیه پرولاکتین نشان‌دار شده با ید رادیواکتیو ۱۲۵، از روش لاکتوپراکسیداز تنوریل و جوهانسون استفاده شد. (۲۶) ۱۰ میکروگرم هورمون در ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با  $PH=7/4$  با ۰/۵ میلی کوری ید رادیواکتیو و ۵ میکروگرم لاکتوپراکسیداز در ویال آزمایش مخلوط گردید. واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ نانوگرم آب اکسیژنه آغاز شد. بعد از دو دقیقه، ۲۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با  $PH=7/4$  به مخلوط اضافه شد. سپس با کروماتوگرافی به وسیله ژل سفادکس  $G100$  در ستونی به ابعاد  $1 \times 35$  سانتی متر با سرعت جریان ۲۰ میلی لیتر بر ساعت، عمل خالص‌سازی هورمون رادیواکتیو انجام پذیرفت. (۲۲) فعالیت ویژه هورمون نشان‌دار شده ۲۰ میکروکوری بر میکروگرم پروتئین تعیین گردید.

برای ارزیابی گیرنده آزاد پرولاکتین از روش سنجش توسط اتصال لیگاند ( $LBA$ ) استفاده شد. (۳۱) نمونه‌هایی که در آنها اتصال ویژه بیش از یک درصد

گذشته برای کاهش اثرات این هورمون روی سلول‌های سرطانی باشد. از آنجا که اندازه‌گیری سطح پلاسمایی پرولاکتین جهت مطالعه حساسیت تومورهای سرطان پستان انسان به این هورمون ارزش ضعیفی دارد و با توجه به این که وجود گیرنده ویژه‌ای جهت اثر هورمون روی سلول هدف ضروریست، در این مطالعه گیرنده آزاد پرولاکتین در غشاء پلاسمایی تومورهای سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها:

پرولاکتین، تریس، دیتریتول، گلیسرول، آلبومین سرم گاوی، کوماسی بریلیانت بلو، لاکتوپراکسیداز، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، کلرید منیزیم، سفادکس  $G100$  و  $EDTA$  از شرکت سیگما، آب اکسیژنه از شرکت مرک و ید رادیواکتیو ۱۲۵ از شرکت امرشام تهیه گردید.

تمام نمونه‌های مورد ارزیابی از نوع سرطان اولیه پستان بودند که بعد از عمل جراحی از بیمارستان‌های دی و امام خمینی تهران جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها بعد از دریافت از اتاق عمل، در نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

غشاء پلاسمایی با استفاده از روش سانتریفوژ افتراقی تهیه شد. ابتدا نمونه به قطعه‌های کوچک‌تری تقسیم شد و با استفاده از دستگاه دس ممبراتور در مجاورت نیتروژن مایع به صورت پودر در آمد. سپس در چهار حجم بافر سرد حاوی ۱۰ میلی مولار تریس-HCl، ۱ میلی مولار  $EDTA$ ، ۰/۵ میلی مولار دیتریتول و ۱۰ درصد گلیسرول با  $PH=7/4$  به وسیله هموژنایزر،

میانگین میزان گیرنده آزاد پرولاکتین در آنها ۱۱۰ فمتومول گیرنده بر میلی‌گرم پروتئین غشایی بود. بیشترین درصد مثبت بودن گیرنده در محدوده سنی بیشتر از ۷۰ سال مشاهده شد. ۸۰ درصد نمونه‌های مورد بررسی در این محدوده سنی دارای گیرنده آزاد پرولاکتین بودند (جدول شماره ۱).

وضعیت گیرنده آزاد پرولاکتین در درجه‌های مختلف بافت‌شناسی تومور ارزیابی گردید. ۷۱ درصد نمونه‌های مورد بررسی درجه دو و ۲۹ درصد درجه سه بودند. ۵۴ درصد نمونه‌های درجه دو دارای گیرنده آزاد پرولاکتین بودند در حالی که میزان گیرنده در نمونه‌های درجه سه، ۴۰ درصد بود. اختلاف معنی‌داری در وضعیت تومورهای دارای گیرنده پرولاکتین در بین این دو گروه مشاهده نشد ( $P < 0.05$ ).

از نظر وضعیت درگیری گره‌های لنفاوی، در ۶۹/۵ درصد بیماران درگیری گره‌های لنفاوی گزارش شد. ۴۰ درصد نمونه‌های بیماران دچار درگیری گره‌های لنفاوی و ۶۴ درصد بیماران فاقد درگیری گره‌های لنفاوی، دارای گیرنده آزاد پرولاکتین بودند که تفاوت معنی‌داری در وضعیت تومورهای دارای گیرنده پرولاکتین در بین این دو گروه دیده نشد ( $P < 0.05$ ). ۵۰ درصد نمونه‌های مورد بررسی متعلق به بیماران قبل از سن یائسگی بودند که ۴۰ درصد این نمونه‌ها گیرنده آزاد پرولاکتین داشتند. نتیجه بررسی در نمونه‌های بیماران بعد از سن یائسگی بیانگر وجود گیرنده آزاد پرولاکتین در ۵۰ درصد نمونه‌ها بود. تفاوت معنی‌داری در وضعیت تومورهای دارای گیرنده پرولاکتین در بین این دو گروه مشاهده نشد.

رادیواکتیو اضافه شده دیده شد به عنوان نمونه‌های دارای گیرنده پرولاکتین در نظر گرفته شدند. جهت سنجش میزان اتصال پرولاکتین نشان‌دار، ۲۰۰ میکروگرم پروتئین غشایی با  $50000\text{cpm}$  از پرولاکتین رادیواکتیو در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر  $TM$  به مدت ۲۰ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس مخلوط واکنش با قدرت  $3000\text{g}$  به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی با دقت کامل جدا شد. میزان شمارش رادیواکتیو رسوب به وسیله دستگاه گاما کانتر تعیین گردید. آزمایشات به صورت دوتایی (*duplicate*) انجام گرفت و میزان اتصال ویژه پرولاکتین نشان‌دار به غشاء به وسیله تفاوت میزان اتصال پرولاکتین نشان‌دار در غیاب و حضور مقدار اضافی پرولاکتین (۵ میکروگرم) تعیین شد. (۲۴)

اطلاعاتی مانند سن بیمار، نوع تومور، وضعیت غدد لنفاوی درگیر و درجه تومور با استفاده از برگه‌های پاتولوژی به دست آمد. جهت آنالیز آماری داده‌ها از آزمون مجذور کای استفاده شد.

### □ یافته‌ها:

در این مطالعه حضور گیرنده آزاد پرولاکتین در ۴۰ نمونه تومور سرطان پستان بررسی گردید. ۸۵ درصد تومورهای مورد بررسی از نوع سرطان مهاجم مجرای بودند. محدوده سنی بیماران مورد بررسی ۳۰ الی ۷۵ سال بود و بیشترین فراوانی در محدوده سنی ۴۰ تا ۴۹ سال مشاهده شد.

از ۴۰ نمونه مورد بررسی، در ۱۸ نمونه (۴۵ درصد) اتصال ویژه بیش از ۱ درصد مشاهده شد که

## جدول ۱ :

فراوانی گیرنده آزاد پرولاکتین در گروه‌های سنی بیماران

گروه سنی (سال)	تعداد نمونه مورد بررسی	درصد	تعداد نومور دارای گیرنده پرولاکتین	درصد
۳۰ تا ۳۹	۸	۲۰	۴	۵۰
۴۰ تا ۴۹	۱۲	۳۰	۴	۳۳
۵۰ تا ۵۹	۷	۱۷/۵	۲	۲۸/۵
۶۰ تا ۶۹	۸	۲۰	۴	۵۰
بیشتر از ۷۰	۵	۱۲/۵	۴	۸۰
جمع	۴۰	۱۰۰	۱۸	-

## بحث و نتیجه‌گیری :

امکان ابتلاء به سرطان پستان با افزایش سن بیشتر می‌گردد. چنانکه در کشورهای غربی با افزایش سن وقوع سرطان پستان تا سن یائسگی افزایش یافته و پس از آن با شیب کمتری ادامه می‌یابد. (۱۶) در این پژوهش وقوع سرطان پستان در گروه‌های سنی مختلف بررسی شد که بیشترین بروز آن مربوط به گروه سنی ۴۰ تا ۴۹ سال بود که با نتایج سایر مطالعات انجام شده در ایران، مطابقت داشت. (۱)

با توجه به این که در ایران بیماران دچار سرطان پستان کمتر در مراحل اولیه بیماری به پزشک مراجعه می‌کنند در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده، تومور درجه یک مشاهده نشد.

تغییر میزان ترشح تعدادی از هورمون‌ها نسبت به وضعیت یائسگی سبب اختلاف در میزان بعضی از گیرنده‌های هورمونی از جمله گیرنده استروژن و گیرنده پروژسترون در تومورهای سرطان پستان در قبل و بعد از سن یائسگی می‌گردد. (۱ و ۱۷ و ۱۹) در این تحقیق

در این مطالعه اتصال ویژه بیش از ۱ درصد پرولاکتین رادیواکتیو اضافه شده در ۴۵ درصد نمونه‌های توموری مورد بررسی مشاهده شد که به عنوان تومورهای دارای گیرنده پرولاکتین در نظر گرفته شدند. این یافته مطابق با گزارش بونیتز بر روی ۲۴۰ نمونه تومور کلی بر روی ۵۰۰ نمونه تومور است که ۴۳ تا ۵۰ درصد تومورهای مورد بررسی آنها گیرنده آزاد پرولاکتین داشتند. (۴ و ۱۳) اما در بررسی هولداوی که بر روی ۴۱ نمونه تومور انجام گرفت درصد کمتری از تومورهای مورد ارزیابی گیرنده پرولاکتین داشتند. (۱۲) اختلاف در فراوانی تومورهای دارای گیرنده پرولاکتین در مطالعات انجام شده را می‌توان ناشی از شرایط سنجش متفاوت، روش‌های متفاوت تهیه غشاء و نیز کیفیت هورمون نشان‌دار رادیواکتیو مورد استفاده دانست. علاوه بر این، ناهمگنی تومورهای سرطان پستان نیز ممکن است در نتایج این گزارش‌ها مؤثر باشد.

*Endocrine Rev* 1998 ; 19 (3) : 225-68

4. Bonneterre J et al. Correlation between prolactin receptors , estradiol , and progesterone receptors in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1986 ; 22 (11) : 1331-6

5. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 ; 72 : 248-54

6. Brinton LA et al. Reproductive factors in the etiology of breast cancer. *Br J Cancer* 1983 ; 47: 757-62

7. Clevenger CV , Freier DO , Kline JB. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. *J Endocrinol* 1998 ; 157 : 187-97

8. Clevenger CV et al. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma : evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am J Pathol* 1995 ; 146 : 695-705

9. Ginsburg E , Vonderhaar BK. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995 ; 55 : 2591-5

10. Guillaumot P , Cohen H. Hetrogeneity of the prolactin receptor in the rat mammary gland and liver during various physiological states. *J Endocrinol* 1994 ; 141 : 271-8

11. Hennighausen L et al. Prolactin signaling in mammary gland development. *J Biol Chem*

ارتباط بین وضعیت یانسگی و میزان تومورهای دارای گیرنده پرولاکتین بررسی شد و اختلاف معنی داری در میزان این تومورها در قبل و بعد از سن یانسگی مشاهده نشد.

با در نظر گرفتن اهمیت ارزیابی گیرنده های فاکتورهای رشد در پیشگویی رفتار بیولوژیک تومورهای سرطان پستان (۱۸) و نتایج این مطالعه که بیانگر حضور گیرنده پرولاکتین در تعدادی از تومورهای سرطان پستان است، ارزیابی این گیرنده در این تومورها به خصوص با در نظر گرفتن ترشح موضعی پرولاکتین از پستان حائز اهمیت است و استفاده از روش های درمانی متکی بر مهار عمل گیرنده پرولاکتین پیشنهاد می گردد.

#### ☐ سپاسگزاران :

تحقیق حاضر به عنوان طرح تحقیقاتی ملی با شماره ۸۸ توسط شورای طرح های تحقیقات ملی ایران (NCRI) تصویب و حمایت گردیده است.

#### ☐ مراجع :

- ۱- هاشمی محمد. بررسی گیرنده استروژن و پروژسترون در تومورهای بدخیم پستان. پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۴
2. Ben Jonathan N et al. Extrapituitary prolactin : Distribution , Regulation , Function , and clinical aspects. *Endocr Rev* 1996 ; 17 (6) : 639-69
3. Bole Feysot C et al. Prolactin and its receptor.

- 1997; 272 (12) : 7567-9
12. Holdaway IM , Friesen HG. Hormone binding by human mammary carcinoma. *Cancer Res* 1977 ; 37 : 1946-52
13. Kelly PA et al. Control of prolactin receptors in normal and neoplastic tissue. *Horm cancer* 1980 : 171-83
14. Kelly PA et al. The interaction of prolactin with its receptors in target tissues and its mechanism of action. *Recent Prog Horm Res* 1984 ; 40 : 379-439
15. L'Hermite M et al. Prolactin and breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988 ; 21 (6) : 955-8
16. Lopez Otin C , Diamandis EP. Breast and prostate cancer. *Endocrine Rev* 1998 ; 19 (4) : 365-96
17. McGuire WL. Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 1978 ; 38 : 4289-91
18. Nandi S. Role of hormones in mammary neoplasia. *Cancer Res* 1978 ; 38 : 4046-9
19. Osborne C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 1998 ; 51 : 227-38
20. Pearson OH et al. Role of pituitary hormones in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 1978 ; 38 : 4323-6
21. Reynolds C et al. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. *Endocrinology* 1997 ; 138 : 5555-60
22. Shiu RPC et al. Radioreceptor assay for prolactin and lactogenic hormones. *Science* 1973; 180 : 968-70
23. Shiu RPC , Friesen HG. Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *Biochem J* 1974 ; 140 : 301-11
24. Shiu RPC , Friesen H. Solubilization and purification of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *J Biol Chem* 1974 ; 249 (24) : 7902-11
25. Shiu RPC et al. Biological actions of prolactin in human breast cancer. *Recent Prog Horm Res* 1987 ; 43 : 277-303
26. Thorell JI , Johansson BG. Enzymatic iodination of polypeptides with  $^{125}\text{I}$  to high specific activity. *Biochim Biophys Acta* 1971 ; 251 : 363-9
27. Turcot Lemay L , Kelly PA. Characterization of estradiol , progesterone , and prolactin receptors in nitrosomethylurea - induced mammary tumors and effect of antiestrogen treatment on the development and growth of these tumors. *Cancer Res* 1980 ; 40 : 3232-40
28. Velkeniers B et al. Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 on growth and prolactin expression. *J Endocrinol* 1994 ; 143 : 1-11
29. Wang DY et al. Relationship of blood

prolactin levels and the risk of subsequent breast cancer. *International J Epidemiol* 1992 ; 21 (2) : 214-22

30. Welsch CW , Nagasawa H. Prolactin and murine mammary tumorigenesis. *Cancer Res*

1977 ; 37 : 951-63

31. Yamamura HI et al. *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis*. New York, Raven Press Ltd, 1990 , PP 1-35