

تأثیر هم کشتی سلول های کبد جنین موش و سلولهای بنیادی کارسینومای جنینی در القاء تمایز آنها به کلنی های خون ساز

مرتضی یافتیان¹، دکتر مؤده صالح نیا^{2*}، دکتر علی اکبر پور فتح اله³

چکیده

مقدمه: با توجه به اهمیت سیستم هم کشتی در تمایز سلولهای بنیادی، هدف اصلی از این مطالعه بررسی تأثیر استرومای کبد جنین موش بر تمایز سلولهای کارسینومای جنینی (P19) است.

روش بررسی: سلولهای P19 به طور مستقیم در محیط نیمه جامد دارای 10% سرم جنین گاو و در غیاب فاکتورهای اگزوزن تکثیر و تمایز یافته و بعد از مدت 8 الی 12 روز به اجسام شبه جنینی (EBs) تبدیل شدند، اجسام شبه جنینی از محیط نیمه جامد خارج و تریپسینه شدند و به شکل سلولهای منفرد و یا دوتایی درآمدند، سپس این سلولها بر روی لایه پشتیبان تهیه شده از سلولهای کبد جنین موش (روز سیزدهم حاملگی) هم کشتی (Co-culture) شدند. پس از گذشت 14 الی 18 روز کلنی های ایجاد شده بر روی لایه پشتیبان مورد بررسی و شمارش قرار گرفتند. جهت تشخیص سلولهای تشکیل دهنده کلنی ها از رنگ گیمسا و جهت تشخیص کلنی های اریترئوئیدی از رنگ بنزیدین استفاده شد.

یافته ها: نتایج شمارش و همچنین رنگ آمیزی کلنی ها با رنگ بنزیدین نشان داد که 94% کلنی ها بنزیدین مثبت و 6% مابقی کلنی های بنزیدین منفی بودند و در رنگ آمیزی گیمسا مشخص شد که سلولهای تشکیل دهنده این کلنی ها میلوئیدی و یا لنفوئیدی بودند. **نتیجه گیری:** بنابراین سلولهای پشتیبان کبد جنینی توانایی القاء تمایز سلولهای کارسینومای جنینی را به رده های خون ساز به خصوص اریترئوئیدی را دارند و احتمالاً می توان در آینده و با انجام تحقیقات بیشتر از این روش هم کشتی برای تمایز سلولهای بنیادی جهت درمان بیماری های خونی استفاده کرد.

واژه های کلیدی: سلولهای کارسینومای جنینی، هم کشتی، تمایز، سلولهای استرومای کبد جنینی.

مقدمه

تکثیر و تمایز این سلولها در محیط *in vitro* است⁽²⁾. سلولهای EC وقتی در شرایط *in vitro* و در محیط نیمه جامد متیل سلولز یا آگار یک درصد قرار بگیرند تشکیل ساختمان سه بعدی بنام اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies) را می دهند که این اجسام حاوی پیش سازهای رده های مختلف سلولی هستند⁽³⁾. استفاده از سلولهای تمایز نیافته کارسینومای جنینی در محیط *in vitro* و تمایز آنها به رده هماتوپویتیک برای اولین بار در سال 1977 توسط Nicolas و همکارانش انجام گرفت. آنها با استفاده از سلولهای Pcc3 که یک رده سلولی از کارسینوماهای جنینی

سلولهای کارسینومای جنینی (Embryonic Carcinoma cells: EC) تمایز نیافته ای هستند با منشاء تراوتوکارسینومایی که به طور مداوم رشد و تکثیر می یابند⁽¹⁾. از ویژگی های بارز این سلول ها توتی پتانسیل بودن آنها و همچنین

* نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم تشریح

تلفن: 88011001 88006544 نمابر: Email: mogdeh@dr.com

1- کارشناس ارشد گروه هماتولوژی

3- دانشیار گروه ایمونولوژی و هماتولوژی

3، 2، 1- دانشگاه تربیت مدرس - تهران

تاریخ دریافت: 83/7/25 تاریخ پذیرش: 84/7/28

مناسب جهت تمایز سلولهای کارسینومای جنینی در محیط In vitro و ایجاد شرایط مناسب برای مطالعه عوامل مؤثر در خون سازی است.

روش بررسی

1- تهیه سلولهای کبد جنینی

موشهای ماده نژاد NMRI با سن حدود 8-12 هفته به صورت یک به یک با موشهای نر در کنار هم قرار گرفته و به منظور تعیین حاملگی صبح روز بعد موشهای ماده از نظر وجود پلاک واژن بررسی شده و موشهای پلاک مثبت جدا و تاریخ زده شدند و آن تاریخ به عنوان روز اول حاملگی در نظر گرفته شد. 13 روز پس از تعیین پلاک مثبت موشهای ماده با جابجای مهره های گردنی کشته شده و در شرایط استریل جنین های آنها از بدنشان خارج و در محیط کشت DMEM (Dulbeccos Modified Egeals Medium) قرار داده شدند، جنین ها دو تا سه بار با این محیط کشت شستشو شده تا خون شویی شوند سپس در پلیت های کشت استریل حاوی محیط کشت DMEM قرار گرفتند. کبد جنینی که در قسمت راست و بالای محفظه شکمی قرار داشت از بدن جنین ها خارج و در لوله در پیچ دار استریل حاوی محیط کشت DMEM حاوی 10% سرم جنین گاو قرار داده شدند و چند بار شستشو شدند.

2- تهیه لایه پشتیبان از کبد جنینی

کبد جنین ها به وسیله اسکالپل به قطعات ریز تبدیل شد و بعد قطعات خرد شده کبد جنینی به وسیله سرنگ استریل 10 cc با سر سوزن 19G و 23G چند بار به داخل لوله مخروطی استریل در پیچ دار فلاش شدند. سلولهای حاصل سه بار با محیط کشت DMEM (دور 1200rpm به مدت 3 دقیقه) شستشو شده اند.

سلولهای حاصل از مراحل شستشو به وسیله محیط کشت DMEM حاوی 2% سرم جنین گاو به غلظت 40×10^3 سلول در میلی لیتر رسیده و در پلیت های مخصوص کشت سلولی ریخته شده و به مدت 24 ساعت در انکوباتور 37°C مرطوب دارای 5% CO_2 قرار داده شدند. بعد از گذشت 24 ساعت سلولهای زنده

است توانستند در شرایط محیط کشت ارگانی باعث تمایز آنها به سلولهای رده اریترئیدی شوند⁽⁴⁾. اما به دلیل اشکالات تکنیکی و نیز وقوع ناهنجاری کروموزومی مطالعه در این خصوص متوقف شد. تا کنون گزارشاتی مبنی بر تمایز سلولهای کارسینومای جنینی (P19) به رده های مختلف سلولی نظیر نرون⁽⁵⁾، عضله اسکلتی⁽⁶⁾، عضله قلبی⁽⁷⁾ و همچنین سلولهای نوروگلیا ارائه شده است⁽⁸⁾، اما در خصوص تمایز سلولهای P19 به رده هماتوپویتیک تا کنون گزارشی به دست نیامده است. لذا با توجه به مزایایی که سلولهای EC نسبت به سلولهای بنیادی جنینی (EC) دارند، مانند در دسترس بودن، کم هزینه بودن، داشتن قدرت تکثیر زیاد در محیط کشت و همچنین عدم تمایز سریع آنها در اثر پاساژهای متوالی⁽⁹⁾، در این تحقیق سعی شده است با توجه به تجربیاتی که در زمینه تمایز سلولهای EC به سلولهای هماتوپویتیک وجود دارد از سلولهای کارسینومای جنینی P19 به عنوان مدلی جهت تمایز در محیط کشت استفاده شود. سلولهای استرومایی ارگان های شرکت کننده در خونسازی مانند سلولهای استرومایی مغز استخوان⁽¹⁰⁾، مزودرم مجاور آنورت⁽¹¹⁾، سلولهای استرومایی طحال⁽¹²⁾ و همچنین سلولهای استرومایی کبد جنینی⁽¹³⁾ می توانند ریز محیط مغزی مناسبی را جهت تکثیر و القای تمایز پیش سازهای سلولهای خونی مشابه با شرایط In vivo فراهم آورند. در طی دوران جنینی موش از روز یازدهم به بعد خونسازی از کیسه زرده به سمت کبد جنینی تغییر مکان پیدا کرده و تا روز هیجدهم دوران حاملگی خونسازی در این ارگان ادامه دارد⁽¹⁰⁾.

با توجه به عدم دستیابی مستقیم به نحوه هماتوپوئز در دوران جنینی داخل رحمی به نظر می آید طراحی یک سیستم مشابه در شرایط in vitro می تواند کمک بسیار مناسبی جهت شناخت مکانیسم های دخیل در تمایز سلول ها به رده هماتوپویتیک باشد.

با توجه به نبود سابقه در خصوص تأثیر لایه پشتیبان کبد جنینی بر تمایز سلولهای کارسینومای جنینی اهداف اصلی این تحقیق بیشتر شامل بررسی تأثیر سلولهای مذکور بر تمایز و تولید سلولهای خونی در محیط کشت است، همچنین پیشنهاد روشی

5- تهیه پیش سازهای سلولی از اجسام شبه جنینی

اجسام شبه جنینی ایجاد شده در محیط نیمه جامد در زیر هود به وسیله پیپت پاستور و با استفاده از میکروسکوپ معکوس از داخل محیط نیمه جامد جدا و در لوله های مخروطی حاوی محیط کشت DMEM که دارای دمای 37°C بود آسپیره شدند. سپس لوله ها ساترینفورژ شده و به رسوب حاصل محلول تریپسین، EDTA اضافه شده و به مدت 15 دقیقه در دمای 37°C انکوبه شدند تا لایه های خارجی اجسام شبه جنینی هضم شده و سلولهای داخلی به صورت منفرد درآیند سپس عمل تریپسین به وسیله سرم جنین گاو خنثی شده و جهت جلوگیری از تمایز سلولها به آن محیط کشت DMEM حاوی 10% FCS و LIF (Leukemia Inhibitory Factor) اضافه شده و در فلاسکهای کشت 25cc کشت داده شدند.

6- هم کشتی سلولهای P19 بر روی لایه پشتیبان

سلولهای حاصله از تریپسین شدن اجسام شبه جنینی بر روی لایه پشتیبان کبد جنین موش که از قبل توسط میتومايسين C فعالیت میتوزی آن متوقف شده بود اضافه شد و به مدت 18-14 روز در انکوباتور 37°C انکوبه و نگهداری شدند. سپس کلنی های شکل گرفته از نظر مرفولوژی، تعداد و نیز رنگ آمیزی با رنگ بنزیدین 0/05 درصد⁽¹³⁾ و رنگ گیمسا مورد بررسی قرار گرفتند و همچنین درصد کلنی های شکل گرفته با استفاده از تست مجذور کای (χ^2) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج**تشکیل اجسام شبه جنینی**

بعد از کشت سلولهای P19 در محیط نیمه جامد با رشد و تشکیل کلنی های کوچک بعد از گذشت 8 تا 12 روز این کلنی ها به اجسام شبه جنینی (EBS) تبدیل شدند (تصویر 1). اندازه این اجسام بسته به طول مدت نگهداریشان در محیط نیمه جامد بین $700\mu\text{m}$ تا $1/5\text{mm}$ متغیر بود و تعداد اجسام شبه جنینی ایجاد شده در محیط نیمه جامد نیز بستگی به تعداد سلولهای P19 اولیه دارد که به طور مستقیم در محیط نیمه جامد

بافت پارانشیمی کبد به کف پلیت چسبیده و سلولهای مرده گلبول های قرمز و سفید و دیگر آرتیفکت های موجود به صورت شناور در محیط کشت قرار گرفته اند که با تعویض محیط کشت این سلولها از محیط عمل خارج شدند. سلولهای چسبیده به کف پلیت به مدت 6 تا 7 روز دیگر در انکوباتور CO_2 نگهداری و در این مدت یک روز در میان محیط کشت آنها تعویض شد در طول این مدت سلولها کاملاً کف پلیت کشت را پر کردند که جهت هم کشتی و یا پاساژ دادن آماده بودند.

3- توقف فعالیت میتوزی سلولهای پشتیبان کبدی

جهت متوقف کردن فعالیت میتوزی سلولها ابتدا محیط کشت لایه پشتیبان را با محیط کشت DMEM حاوی 10% سرم جنین گاو (FCS) و $10\mu\text{g/ml}$ میتومايسين C تعویض کرده و به مدت 2 الی 3 ساعت در انکوباتور 37°C قرار داده شدند بعد از گذشت این زمان جهت حذف میتومايسين C سلولها 3 بار با بافر PBS فسفات بافرسالین استریل فاقد یون کلسیم و منیزیم شستشو شدند بعد از آخرین مرحله شستشو بر روی سلولها محیط کشت DMEM حاوی 2% سرم جنین گاو اضافه شده و در انکوباتور 37°C قرار داده شدند بعد از گذشت 24 ساعت سلولها آماده هم کشتی بودند.

4- کشت سلولهای P19 در محیط نیمه جامد

جهت تشکیل اجسام شبه جنینی از سلولهای P19 تهیه شده از انستیتو پاستور ایران استفاده شده است سلولهای مذکور در محیط نیمه جامد حاوی 50% محیط کشت DMEM، 20% سرم جنین گاو و 30% آگار یک درصد به غلظت 4×10^3 در میلی لیتر رسیده و در داخل پلیت های کشت به قطر 6cm ریخته شدند، به مدت 2 دقیقه پلیت های کشت در یخچال 4°C قرار داده شدند، آگار موجود در سوسپانسیون باعث نیمه جامد شدن محیط کشت شده، سپس پلیت های کشت در انکوباتور 37°C مرطوب دارای 5% CO_2 به مدت 8 روز انکوبه شده که در طول این مدت اجسام شبه جنینی (EBS) در داخل محیط نیمه جامد شکل گرفت.



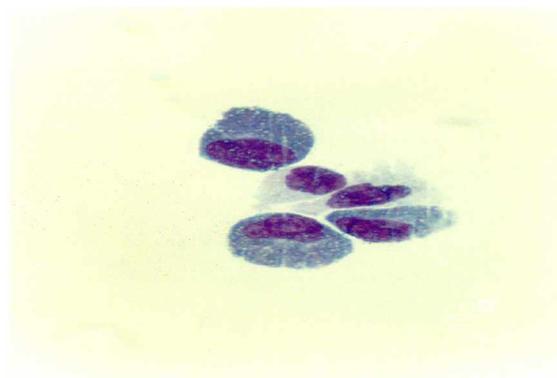
تصویر ۱. نمایی از اجسام شبه جنینی ایجاد شده پس از کشت در محیط نیمه جامد با بزرگنمایی $\times 400$



تصویر ۲. نمایی از کلنی های اریتروئیدی شکل گرفته بر روی لایه پشتیبان با بزرگنمایی $\times 400$



تصویر ۳. نمایی از کلنی های اریتروئیدی بنزیدین مثبت بر روی لایه پشتیبان با بزرگنمایی $\times 400$



تصویر ۴. نمایی از سلولهای اریتروئیدی و غیر اریتروئیدی رنگ آمیزی شده با گیمسا با بزرگنمایی $\times 400$

کشت می شوند تقریباً به ازای هر 4×10^4 سلول P19 کشت شده به طور متوسط 20-30 EBS ایجاد شده است.

هم کشتی و Colony assay سلولهای P19 بر روی لایه پشتیبان پس از کشت سلولهای کبد جنین بعد از مدت 24 ساعت این سلولها به کف پلیت کشت چسبیده و دارای زوائد سیتوپلاسمی شده و آماده برای تیمار با میتوماپسین C و متعاقب آن هم کشتی شدند. 14-18 روز پس از کشت سلولهای حاصل از تریسینه شدن اجسام شبه جنینی (ایجاد شده از سلولهای P19 بر روی لایه پشتیبان کبد جنینی در محیط نیمه جامد) کلنی های بر سطح لایه پشتیبان ایجاد شدند (تصویر ۲) و مرفولوژی کلنی ها توسط میکروسکوپ معکوس و رنگ آمیزی بنزیدین مشخص شد که اکثر کلنی های که بدین شکل ایجاد شده اند از نوع اریتروئیدی بودند (تصویر ۳).

کلنی های اریتروئیدی به دلیل دارا بودن هموگلوبین با بنزیدین واکنش نشان داده و به رنگ آبی تیره در می آیند. تعداد کمی هم کلنی هایی وجود داشت که با بنزیدین واکنش نشان نداده (جدول ۱) و در بررسی مرفولوژی این سلول ها با رنگ آمیزی گیمسا مشخص شد که این سلول ها می توانند مربوط به رده میلوئیدی و یا لنفوئیدی باشند (تصویر ۴) در تصویر مذکور دو رده سلولی مربوط به رده اریتروئیدی و میلوئیدی دیده می شود سلولهای اریتروئیدی سیتوپلاسم اسیدوفیل تر داشته ولی سلولهای میلوئیدی سیتوپلاسم بازوفیل تر و بزرگتر دارند.

جدول ۱: هم کشتی سلولهای P19 و Colony assay سلولهای مذکور بر روی لایه پشتیبان کبد جنین موش

دفعات آزمایش	تعداد سلولهای P19 هم کشتی شده	بنزیدین مثبت	بنزیدین منفی	تعداد کل
اول	5×10^4	25	2	27
دوم	5×10^4	29	1	30
سوم	5×10^4	23	2	25
تعداد کل	-	77	5	82
درصد	-	94	6	100
میانگین	-	25	1/6	-
انحراف معیار	-	± 3	$\pm 0/6$	-

بحث و نتیجه گیری

القاء تمایز در سلولهای EC به رده های مختلف سلولی در محیط کشت می تواند یک مدل یا سیستم مناسبی برای درک مراحل تمایز و تعهد پیش سازهای رده های سلولی باشد. به صورت مختلف می توان تمایز را در سلولهای ریشه ای القاء نمود از این میان می توان به استفاده از سیستم های هم کشتی، استفاده از فاکتورها و سیتوکاین های مختلف سلولی و در نهایت به تلفیقی از دو روش فوق یعنی استفاده از سیستم هم کشتی در حضور فاکتورهای مختلف رشد اشاره کرد (14،15).

در خصوص استفاده از سیستم هم کشتی که در این تحقیق نیز از این روش جهت القای تمایز سلولهای کارسینومای جنینی استفاده شده است فرضیه اصلی مبنی بر آزاد سازی فاکتورهای مؤثر رشد توسط سلولهای لایه پشتیبان است که می تواند یک ریز محیط مناسب به شکل موضعی برای القاء تمایز مشابه آنچه که در سیستم *in vivo* است، بوجود آورد. اولین گزارش در خصوص استفاده از سلولهای کارسینومای جنینی در تمایز به رده هماتوپوئیتیک مربوط به رده سلولی PCC3 است که به دلیل پایین بودن سطح اریتروپوئیز و همچنین داشتن کاربوتایپ غیرطبیعی استفاده از این سیستم محدود شد (4).

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که سلولهای (P19) EC در شرایط مناسب محیط کشت به سلولهای هماتوپوئیتیک تمایز پیدا می کند (اریتروئیدی - غیر اریتروئیدی). 94% این کلنی ها با رنگ بنزیدین واکنش مثبت و درصد مختصری هم بنزیدین منفی بودند (6%).

در همین ارتباط در سال 1987 Koduma و همکارانش نیز با استفاده از سلولهای استرومایی مغز استخوان به عنوان لایه پشتیبان و هم کشتی سلولهای بنیادی خونساز بر روی آن بدون حضور فاکتورهای آگروژن باعث تکثیر و تمایز پیش سازهای سلولهای خونی به رده های مختلف سلولهای خونساز شدند و دلایل عمده این تمایز را مربوط به تماس فیزیکی و مستقیم بین سلولهای استرومایی و سلولهای خون ساز، وجود ماتریکس خارج سلولی و ترشح فاکتورهای هماتوپوئیتیک توسط لایه پشتیبان دانستند (16). همچنین در سال 1991 Ohneda و همکارانش با

استفاده از لایه پشتیبان کبد جنین موش و هم کشتی سلولهای پیش ساز خونی به دست آمده از کبد جنین موش در محیط *in vitro* باعث تشکیل کلنی های بزرگ اریتروئیدی (بنزیدین مثبت) بر روی این لایه پشتیبان شدند (13).

Kaufman و همکارانش در سال 2002 در طی تحقیقی بیان کردند که لایه پشتیبان حاصل از سلولهای استرومایی مغز استخوان (S17) و همچنین لایه پشتیبان حاصل از سلولهای اندوتلیال کیسه زرده در غیاب فاکتورهای آگروژن و فقط در حضور 15% سرم جنین گاو می تواند باعث تمایز سلولهای بنیادی جنینی انسانی به رده های مختلف سلولهای هماتوپوئیتیک مانند رده های اریتروئیدی، مگاکاریوسیتی و میلوئیدی شوند (17).

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و نیز آزمایشات قبلی که توسط دانشمندان مختلف صورت گرفته است نشان داده شده است که لایه پشتیبان بدست آمده از مناطق مختلف خون سازی می توانند در شرایط *in vitro* نیز همانند محیط *in vivo* یک ریز محیط مغزی مناسبی را جهت تمایز رده های مختلف سلولهای هماتوپوئیتیک فراهم آورند و باعث تمایز سلولهای پیش ساز به رده خاصی از سلول ها شوند و چون در کبد جنین 13 روزه موش بیشتر رده اریتروئیدی ظاهر می شود بنابراین در شرایط محیط کشت نیز بیشتر سلولها به کلنی های اریتروئیدی متمایز شده اند. پس در مجموع سلولهای استرومایی کبد جنین موش با فراهم آوردن شرایط مشابه با دوران ابتدای جنینی که باعث تمایز پیش سازهای سلولهای خونی به رده اریتروئیدی می شوند در محیط *in vitro* نیز ظهور کلنی های اریتروئیدی را القاء می نماید.

سپاسگزاری

از راهنمایی های ارزنده آقای مسعود سلیمانی و همکاری سرکار خانم معزی در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می شود.

References

1. Martin GR, Bruyns M, Landorp S. *Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis*. Science, 1980; 209: 768-776.
2. Solter SJ, Andrews PW, Przyborski SA, Thomson JA. *Embryonal carcinoma cells as embryonic stem cells*. In: Marshak DR, Gardner R, Gottlieb D, eds. Stem cell Biology. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, Monograph, 2001; 40: 231-266.
3. Risau W, Sariola H, Zerwes H-G, Kemler R. *Differentiation of embryonic carcinoma cells into embryonic body*. Development, 1988; 102: 471.
4. Nicolus J, Andrews PW, Damjanov I, Simon D. *Pluripotent human embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line PCC3 differentiation in vivo and in vitro*. Lab Invest, 1977; 50: 147-162.
5. MacPherson PA, MCBurney MW. *P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons to genetic manipulation. Methods: a companion to Methods in Enzymology*, 1995; 7: 238-252.
6. Jones-Villeneuve EM, MCBurney MW, Rogers KA. *Embryonal carcinoma cells and in vitro muscle development*, 1982; 94: 253-262.
7. Robbins J, Gulick J, Sanchez A. *Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development in vitro*. J Biol Chem., 1990; 265: 11905.
8. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C. *In vitro differentiation of embryonic carcinoma cells into glial cells and functional neurons*. J Cell Sci, 1995; 108: 3181-3186.
9. Martin GR. *Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis*. Science, 1980; 209: 768-776.
10. Paolo Bianco, Martin D, Vvanse C. *Bone marrow stromal stem cell, nature, biology, and potential application*. Stem Cell, 2001; 19(3): 180-192.
11. Wong P, Evanse C. *Properties of the earliest clonogenic hematopoietic precursors to appear in the developing AGM*. Nat Acad Sci USA. 1986; 78: 2412-2416.
12. Nilesen P, Potonick A, Evan M. *In vitro generation of erythroeid precursors from embryonic stem cell, on the mouse spleen*, EMBO J. 1994; 13: 5274-5283.
13. Ohneda O, Yanal N, Obinat M, *Microenviroment created by stromal cells is essential for rapid expansion of erythroid in mouse fetal liver*. Development 1990; 110: 379-384.
14. Johnsson B, Wilesin M. *Evidence for involvement of interleukin-3 and Bone morphogenic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development*. Mol Cell Biol, 1995; 15: 141-151.
15. Schmitt R, Bruyns M, Landorp S. *Heamatopoietic development of embryonic stem cell in vitro*. Gen Dev, 5: 728-740, 1991.
16. Kodama H, Nakano T, Honjo T. *Generation of lymphohematopoietic cells embryonic stem cell in culture*. Science, 1994; 265: 1098.
17. Kaufman MH, Gottgens B, Sinclair AM. *An SCL 3 enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult hematopoietic progenitors*. Development, 2002; 126: 3891-3904.