

NGHIÊN CỨU TẠO PHỨC HỢP CỦA ARTEMISININ-2-HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN ĐỂ HỖ TRỢ ĐIỀU TRỊ UNG THƯ

Lê Quang Huấn¹, Hà Thị Thanh Hương^{2,3}, Vũ Dương Thanh²,
Phạm Thị Quỳnh Trang², Đái duy Ban¹

TÓM TẮT

Thuốc trị sốt rét Artemisinin (Art) và các dẫn xuất của nó đã được khám phá như là chất chống ung thư tiềm năng. Các hợp chất Art có thể khiến tế bào ung thư nhạy cảm với quá trình ferroptosis, một dạng chết tế bào theo chương trình mới do quá trình peroxy hóa lipid phụ thuộc vào sắt. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng quy trình tách chiết kết hợp với việc tạo phức hệ với 2-hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HPbCD) để thu chế phẩm Art-HPbCD trực tiếp từ cây Thanh hao hoa vàng (*Artemisia annua* L.). Phức hệ Art-HPbCD thu được có kích thước 162 nm chứa 36,496 $\mu\text{g/mL}$ Art. Phức hệ Art-HPbCD được xác định IC₅₀ là 3,0 $\mu\text{g/mL}$ khi thử nghiệm trên tế bào ung thư vú MCF7 và 2,4 $\mu\text{g/mL}$ khi thử nghiệm trên tế bào ung thư gan HTCC116. Thử nghiệm độc tính trên chuột đã xác định LD₅₀ là 4,2 g/kg theo đường uống và theo đường tiêm là 3,2 g/kg. Phức hệ với liều 20 mg/mL sử dụng liên tục 28 ngày không gây tổn thương gan, thận, phổi của động vật thí nghiệm và Khối u nhân tạo trên chuột tiêu biến hoàn toàn sau 25 ngày với 5 liều điều trị (một liều 20 mg/mL).

¹*Viện Công nghệ sinh học, VAST;*

²*AQP-Phenikaa;*

³*Viện hóa học các hợp chất thiên nhiên, VAST;*

Chịu trách nhiệm chính: Lê Quang Huấn

Email: huanlequang@gmail.com

Ngày nhận bài: 31.8.2022

Ngày phản biện khoa học: 13.9.2022

Ngày duyệt bài: 24.9.2022

SUMMARY

RESEARCH FOR CREATION OF ARTEMISININ-2-HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN COMPLEX TO SUPPORT CANCER TREATMENT

The antimalarial drug Artemisinin (Art) and its derivatives have been explored as potential anticancer agents. Art compounds can sensitize cancer cells to ferroptosis, a new form of programmed cell death caused by iron-dependent lipid peroxidation.

In this study, we developed an extraction procedure using a 10% solution of 2-hydroxypropyl- β -Cyclodextrin to obtain the Art-HPbCD complex directly from *Artemisia annua* L. The obtained Art-HPbCD complex having size 162 nm contains 36.496 $\mu\text{g/mL}$ Art. The Art-HPbCD complex have an IC₅₀ of 3.0 $\mu\text{g/mL}$ when test on MCF7 breast cancer cells and 2.4 $\mu\text{g/mL}$ when test on HTCC116 liver cancer cells. Toxicity testing in rats determined an LD₅₀ of 4.2 g/kg orally and an injection of 3.2 g/kg. Using the Art-HPbCD complex at a dose of 20 mg/mL continuously for 28 days there was no damage to the liver, kidneys, lungs of experiment animals and the artificial tumor was completely destroyed after 25 days with 5 doses (one dose is 20 mg/mL).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo ước tính của tổ chức Y tế thế giới (WHO) đến năm 2032 có khoảng 22 triệu trường hợp ung thư mới và 13 triệu người chết mỗi năm. Trong số 172 quốc gia và

vùng lãnh thổ được khảo sát (WHO công bố tháng 5/2014), Việt Nam đứng ở vị trí 78, cụ thể, tỷ lệ chết vì ung thư ở Việt Nam là 110 ca/100.000 người. Mỗi năm Việt Nam có khoảng 200.000 ca ung thư mới, trong đó có 75.000 ca tử vong.

Ferroptosis là một dạng chết tế bào phụ thuộc vào sắt mới được phát hiện, khác với các dạng chết khác. Ferroptosis đóng một vai trò quan trọng trong việc ức chế khối u, một cơ hội mới cho liệu pháp điều trị ung thư [Li et al., 2020].

Art được Tu Youyou phát hiện tác dụng điều trị sốt rét [Kannan et al., 2005]. Sau đó, Art đã được chứng minh có tác dụng chống viêm, trị tiểu đường, gây hoại tử và apoptosis ở nhiều tế bào ung thư [Zhou et al., 2012]. Art hoạt động theo cơ chế: Làm ngưng chu kỳ tế bào, ức chế hình thành mạch, ức chế sự di căn và gây ferroptosis [Wang et al., 2015, Hu et al., 2022]. Art không tan trong nước nên khả dụng sinh học thấp, nhiều nghiên cứu tăng hiệu quả điều trị của Art như tạo liposome, hệ dẫn nano. Để tăng hiệu quả điều trị của Art, Zhu và cs, (2022) đã tạo phức hệ Art-HPbCD và bọc chúng bởi tinh bột xốp. Tuy nhiên, quy trình khá phức tạp. Trong nghiên cứu của chúng tôi phức hệ Art-HPbCD được tạo trực tiếp từ nguyên liệu trong quá trình tách chiết. Phức hệ thu được là nguyên liệu chính để tạo chế phẩm an toàn và có khả năng tiêu biến khối u trên động vật thí nghiệm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Artemisinin (Art) và 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPbCD) được mua của Hãng Sigma-Aldrich; Chuột nhắt trắng chủng Swiss 5 tuần tuổi nặng 20-24g, trưởng thành và khỏe mạnh được cung cấp từ Viện Vệ

sinh dịch tễ Trung ương. Chuột được nuôi ở điều kiện bình thường (12 giờ sáng, 12 giờ tối, nhiệt độ nuôi duy trì ở 25-30 oC) trong 7 ngày để thích nghi với môi trường thí nghiệm; Hóa chất gây khối u: methylcholanthrene; dầu Oliu; và các dung môi hóa chất cần thiết khác có độ tinh sạch cần thiết đáp ứng yêu cầu của phòng thí nghiệm.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Tách chiết Art sử dụng HPbCD

Cân 2g bột cây thanh hao hoa vàng khô để hoà trong dung dịch 10% HPbCD. Hỗ hợp được khuấy đều 20 phút ở 40 oC, sau đó siêu âm trong 30 phút với cường độ 20 kHz, 300 W, nhiệt độ 40-50 oC. Lọc qua vải và màng lọc 0,45 μ m để thu dịch. Loại dung môi bằng máy cô quay chân không ở 60 oC (hoặc đông khô ở -50 oC) để thu mẫu nguyên liệu. Phân tích kích thước và hàm lượng Art trong mẫu. Mẫu đối chứng sử dụng H₂O thay cho dung dịch 10% HPbCD.

2.2.2. Xác định hàm lượng Artemisinin và kích thước sản phẩm

Hàm lượng Art trong mẫu được xác định bằng phương pháp HPLC (theo quy trình của Mwangi et al., 2020). Xác định kích thước phức hệ theo phương pháp của Peerzade et al., (2020).

2.2.3. Xác định độc tính cấp của chế phẩm Art/HPbCD

Khảo sát độc tính cấp của Art/HPbCD theo phương pháp Litchfield–Wilcoxon 40 chuột nhắt đối 12h qua đêm được chia ngẫu nhiên thành 4 lô (N=10), mỗi lô chuột được cho uống 3 lần trong vòng 24 giờ, mỗi lần cách nhau 3 giờ của dung dịch Art/HPbCD khác nhau với bước nhảy liều là 25%. Theo

đổi số chuột chết, sống trong vòng 72 giờ sau thử nghiệm và quan sát các dấu hiệu sau trong vòng 7 ngày về: Hành vi, cân nặng cơ thể, hệ tiêu hóa, hệ bài tiết, hệ hô hấp và chuột sẽ được mổ để quan sát đại thể những động vật bị chết trong thời gian theo dõi. Xác định liều LD50, liều an toàn và liều dung nạp tối đa dung dịch Art/HPbCD trên chuột nhất.

2.2.4. Xác định độc tính bán trường diễn của Art/HPbCD

Từ liều an toàn của dung dịch Art/HPbCD khi dùng nhiều lần không gây thay đổi đáng kể tới chức năng, cơ quan hoặc hoạt động sinh lý chuột thí nghiệm. Chuột được thử nghiệm ở 3 mức liều thấp, liều trung bình và liều cao của dung dịch Art/HPbCD với 8 tuần, theo dõi các hành vi, cân nặng, các chỉ số huyết học và sinh hóa, phân tích mô bệnh học. Các tiêu bản mô gan thận được xét nghiệm bằng phương pháp hóa mô miễn dịch. Sử dụng phần mềm thống kê SPSS 20.0 để xử lý số liệu. So sánh sự khác biệt thống kê giữa các nhóm bằng t-test và Anova-test với độ tin cậy 95%. Các kết quả được biểu diễn dạng giá trị trung bình \pm SD.

2.2.5. Gây khối u thực nghiệm trên chuột

Các chuột bạch dòng Swiss (4-6 chuột) được tiêm dưới da với 1 mL dung dịch hóa chất (methylcholanthrene pha trong dầu oliu với nồng độ 0,1 mg/mL) để tạo khối u. Mô khối u được sinh thiết để kiểm tra các tế bào ung thư.

Xác định tế bào ung thư trong khối u tạo ra trong động vật thí nghiệm

Xác định các tế bào ung thư trong mô khối u được lấy ra từ khối u trên chuột thí nghiệm bằng phương pháp nhuộm với hemotoxylink.

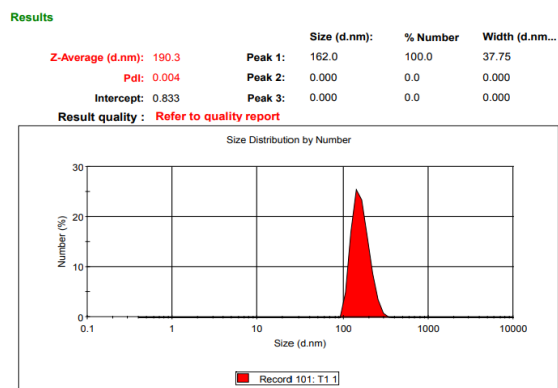
2.2.6. Xác định tác dụng tiêu u của phức hệ Art/HPbCD

Sử dụng Art/HPbCD theo đường uống hoặc tiêm tĩnh mạch với 1 mL dung dịch phức hệ Art/HPbCD (nồng độ 20 mg/mL) cho 3-5 chuột Swiss có trọng lượng 18-20 gram có khối u xuất hiện rõ. Theo dõi tình trạng tiêu biến khối u theo thời gian từ khi tiêm cho đến khi khối u tiêu biến hoàn toàn.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tạo phức hệ Art-HPbCD

Bột Thanh hao hoa vàng (500g) được hòa trong 10% dung dịch HPbCD. Khuấy đều, sau đó siêu âm trong 15 phút với cường độ 20 kHz, 300 w. Kích thước phức hệ tạo ra được xác định trên thiết bị Malvern là 162 nm (Hình 1) và hàm lượng Art được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-Shimadzu với hệ dung môi ở pha động là methanol-nước (MeCN:H₂O tỉ lệ 45:55), bước sóng 205 nm; tốc độ dòng chảy: 1,2 mL/phút) là 36,496 μ g/mL. Mẫu chiết và tạo phức hệ sau đó được đông khô để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Kích thước phức hệ Art-HPbCD được xác định trên thiết bị MALVERN.

Đánh giá độc tính trên các dòng tế bào ung thư ung thư vú MCF7 và ung thư gan

HCT116 theo phương pháp MTT. Kết quả đối với dòng tế bào ung thư gan HTC116 thì với nồng độ 0,1 μ g/mL, phần trăm tế bào sống thấp hơn so với đối chứng là 12,5%, với nồng độ 25 μ g/mL, phần trăm tế bào sống thấp hơn so với đối chứng là 90,1%, IC50 = 2,4 μ g/mL. Với dòng tế bào ung thư vú: nồng độ 0,1 μ g/mL thuốc có tác động lên sức sống dòng tế bào MCF7, phần trăm tế bào sống thấp hơn đối chứng 10,9%. Tại nồng độ 25

μ g/mL, phần trăm tế bào sống thấp hơn so với đối chứng là 89,1%, IC50 = 3,0 μ g/mL.

3.2. Kết quả gây khối u trên chuột

Các chuột bạch dòng Swiss được tiêm dưới da với 1mL dung dịch hóa chất (methylcholanthrene pha trong dầu oliu với nồng độ 0,1 mg/mL) để tạo khối u. Mô khối u được sinh thiết để kiểm tra các tế bào ung thư. Kết quả tạo khối u được biểu lộ trên hình 2.



Hình 2. Kích thước khối u của chuột tạo được khi tiêm methylcholanthrene pha trong dầu oliu với nồng độ 0,1 mg/mL.

3.3. Kết quả xác định độc tính của chế phẩm ArtHPbCD

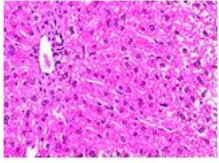
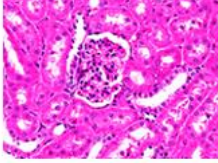
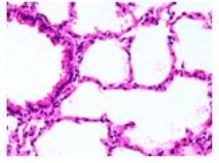
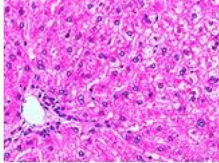
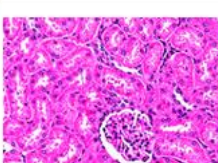
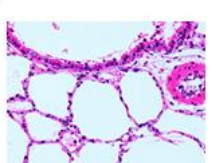
Kết quả cho thấy tất cả các lô chuột thử nghiệm với các liều Art/HPbCD đều khỏe mạnh, di chuyển và ăn uống bình thường, da, lông, mắt cũng như các chức năng tiêu hóa, hô hấp, vận động, thần kinh đều bình thường và không có chuột nào chết trong vòng 72 giờ hay có tiền lượng chết sau 7 ngày. Đồng thời, cân nặng chuột của các lô thí nghiệm sau 7 ngày đều tăng bình thường và không có sự khác biệt có ý nghĩa về cân nặng giữa các liều thử nghiệm ($p > 0,05$). Kết quả thử nghiệm cho thấy Art có độc tính cấp thấp. Kết quả thử nghiệm cho thấy theo đường uống LD50 là lớn hơn 4,2 g/kg và theo đường tiêm là lớn hơn 3,2 g/kg. Ở liều cao, thử nghiệm trên động vật, Art/HPbCD và dẫn chất có độc tính trên thần kinh. Tuy

nhiên, độc tính này hiếm khi xảy ra trên người khi dung mức liều 10-25 mg/kg/ngày.

3.4. Kết quả xác định độc tính bán trường diễn của phức hệ Art/HPbCD

Thử nghiệm được tiến hành trên chuột nhắt trắng trọng lượng 18 – 20 g/con. Chuột được chia ngẫu nhiên thành 10 lô, mỗi lô 10 con. Chuột được cho uống dung dịch Art/HPbCD với liều suy diễn từ liều dự kiến sử dụng trên người là 20 mg/kg/ngày, một lô được sử dụng làm đối chứng chỉ tiêm nước cùng thể tích tương đương trọng lượng như lô điều trị liên tục trong 28 ngày.

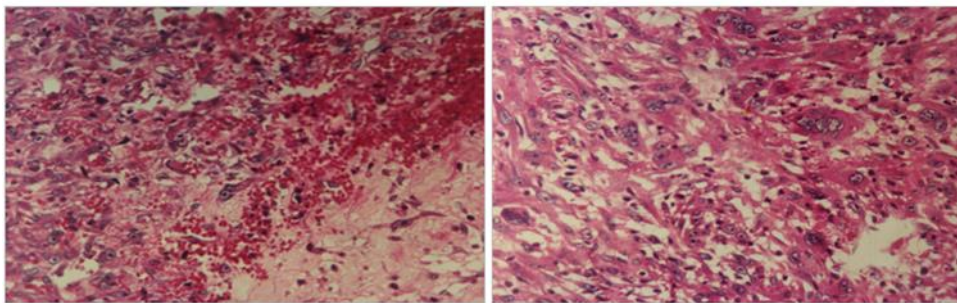
Kết quả: Thể trạng và tình trạng chung của chuột được theo dõi trước và sau khi thử nghiệm đều tốt, không có biểu hiện bất thường nào. Sau thời gian 28 ngày sử dụng Art/HPbCD tế bào gan và thận đều bình thường (hình 3).

Nhóm	Hình ảnh mô gan	Hình ảnh mô thận	Hình ảnh mô phổi
Nhóm chứn			
Nhóm thử			

Hình 3. Hình ảnh giải phẫu mô bệnh học gan, thận và phổi (Hình ảnh nhuộm HE, Độ phóng đại 400 lần)

3.5. Kết quả xác định tế bào ung thư ở động vật thí nghiệm

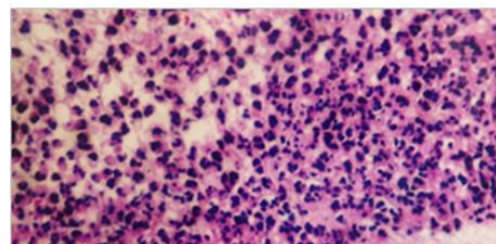
Xác định các tế bào ung thư trong mô khối u được lấy ra từ khối u trên chuột thí nghiệm bằng phương pháp nhuộm với hemotoxylink. Kết quả (được thể hiện trên hình 4) cho thấy xuất hiện các tế bào nhân quái, nhân chia (tế bào ung thư) trong các mô.



Hình 4. Ảnh chụp giải phẫu mô của khối u đã tạo được trên chuột: Nhiều tế bào ung thư dạng Fibrosarcoma với các kích thước to, nhỏ khác nhau, nhân kiềm tính, nằm trong tổ chức liên kết. (Hình ảnh nhuộm HE, Độ phóng đại 400 lần).

3.6. Kết quả xác định tác dụng tiêu u của phức hệ Art/HPbCD

Xác định khả năng tiêu u của phức hệ Art/HPbCD cũng được xác định qua hình ảnh giải phẫu bệnh lý tế bào nhân quái-nhân chia (tế bào ung thư) không còn nữa, các tế bào trở về bình thường (hình 5)

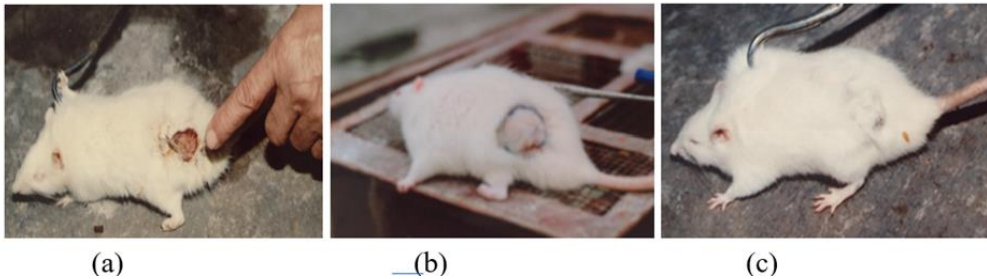


Hình 5. Ảnh chụp giải phẫu mô sau khi điều trị bằng phức hệ Art/HPbCD. Kết quả cho thấy không còn tế bào nhân quái, nhân chia (tế bào ung thư) (Hình ảnh nhuộm HE, Độ phóng đại 400 lần).

3.7. Kết quả gây tiêu biến khối u

Về mặt hình thái khối u sau khi sử dụng phức hệ Art/HPbCD cho thấy khối u trên thực

nghiệm trên chuột đã được tiêu biến sau thời gian 25 ngày (hình 6).



Hình 6. Ảnh chụp sự tiêu biến khối u sau khi sử dụng phức hệ Art/HPbCD sau 15 ngày (a), sau 20 ngày (b) và sau 25 ngày (c).

Đối với các chuột đã gây khối u mà không sử dụng phức hệ Art/HPbCD thì khối u vẫn phát triển và chuột chết sau 40 ngày.

VI. BÀN LUẬN

Artemisinin (Art) được dùng trong điều trị sốt rét do tác dụng diệt ký sinh trùng sốt rét thể vô tính trong hồng cầu. Gần đây, các công dụng khác cũng đã được xác định, đặc biệt là khả năng tiêu diệt tế bào ung thư nhanh và hiệu quả. Các cơ chế chống ung thư của Art bao gồm ức chế chu kỳ tế bào, ức chế hình thành mạch khối u, tổn thương DNA và tạo ferroptosis. Ferroptosis là một loại chết tế bào theo chương trình không phổ biến, bao gồm điều hòa chuyển hóa sắt, tạo ra các loại oxy phản ứng (ROS) và kích hoạt căng thẳng lưới nội chất (ERS). Thí nghiệm của Waseem et al., (2018) đã chứng minh rằng việc bổ sung axit aminlevulinic (ALA) làm tăng các đặc tính chống ung thư đại trực tràng của Art.

Zhou et al., (2022) đã đưa ra giả thuyết về cơ chế tác động của artemisinin: (I) Art tạo ra ROS (Reactive Oxygen Species), dẫn đến tăng biểu hiện của các thụ thể chết, và phân cắt caspase-3 và caspase-8, đồng thời giảm biểu hiện c-FLIP, dẫn đến kích thích con đường apoptosis bên ngoài. Trong khi đó,

bản thân ROS cũng kích hoạt con đường apoptosis nội tại bằng cách điều chỉnh sự biểu hiện của tBID, BAX/BAK, gây ra sự giải phóng Cytochrome C để kích hoạt caspase-9. (II) Sự tích tụ ROS từ các loại thuốc loại Art dẫn đến quá trình peroxy hóa lipid để tạo ra quá trình ferroptosis. Bên cạnh đó, sự phá vỡ hệ thống duy trì cân bằng nội môi oxy hóa bởi các loại thuốc loại Art dẫn đến sự điều hòa biểu hiện GPX4. (III) Stress oxy hóa từ các loại thuốc loại ART bắt đầu hình thành phagophore thông qua việc kích hoạt con đường AMPK và tập hợp phức hợp VPS34, dẫn đến hiện tượng autophagy. Thuốc Art cũng gây ra hoại tử (IV), hoặc gây ra pyroptosis (V). Các nghiên cứu đã chứng minh rằng 80% liều dùng đường uống được thải qua phân và nước tiểu trong 24 giờ, 68% liều tiêm tĩnh mạch được tìm thấy trong nước tiểu trong 24 giờ đầu và 95% được tìm thấy trong 72 giờ. Thời gian bán thải của Art rất ngắn, với đường uống là gần 4 giờ và tiêm bắp từ 3,85 – 5,38 giờ.

Một trong các sản phẩm được sử dụng để hỗ trợ điều trị ung thư là ARFeMAX của

Hungary là sản phẩm chứa Art kết hợp với viên sắt. Kết quả là chỉ sau 8 tiếng $\frac{3}{4}$ tế bào ung thư bị tiêu diệt và sau 16 tiếng thì nó tiêu diệt hoàn toàn 100% tế bào ung thư còn lại. Trong khi đó các tế bào lành vì không có nhiều sắt nên không bị ảnh hưởng [<https://navita.hu/en/product/arfemax/>].

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy phức hệ Art/HPbCD có mức độ độc tính thấp nên sau thời gian sử dụng liều 20 mg/kg/ngày ở chuột với thời gian 28 ngày không gây tổn thương các cơ quan nội tạng của chuột, giải phẫu gan, thận và phổi của chuột đều cho thấy các mô này không có sự khác biệt với các mô tương ứng ở chuột của lô đối chứng. Điều quan trọng nhất là khối u của chuột được tiêu biến hoàn toàn sau 25 ngày sau khi sử dụng 5 liều điều trị cách nhau 5 ngày (mỗi liều 20 mg/kg/ngày) theo đường uống hoặc tiêm. Sự khác nhau khi sử dụng theo đường uống và đường tiêm là không rõ ràng.

Hiệu quả tác động của phức hệ Art/HPbCD đối với việc tiêu biến khối u, theo chúng tôi, ngoài tác động của Art còn có sự cộng hưởng tác động của HPbCD.

V. KẾT LUẬN

1) Đã xây dựng được quy trình tạo phức hệ Artemisinin -2 – Hydroxypropyl – β - Cyclodextrin theo quy trình tách trực tiếp từ cây thanh hao hoa vàng (*Artemisia annua* L.) với hàm lượng Art là 36,496 $\mu\text{g/mL}$, kích thước phức hệ là 162 nm.

2) Thử nghiệm độc tính theo phương pháp MTT trên các dòng tế bào ung thư vú MCF7 và ung thư gan HTCC116 đã xác định được IC50 tương ứng là 3,0 $\mu\text{g/mL}$ và 2,4 $\mu\text{g/mL}$. Liều độc theo đường uống xác định theo LD50 là lớn hơn 4,2 g/kg và theo đường tiêm là lớn hơn 3,2 g/kg.

3) Sử dụng phức hệ Art-HPbCD sau 28 ngày với liều 20 mg/mL không gây tổn thương các cơ quan nội tạng như gan, thận, phổi của động vật thí nghiệm.

4) Khối u nhân tạo trên chuột được tiêu biến hoàn toàn sau 25 ngày với 5 liều sử dụng (một liều là 20 mg/mL).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hu Y, Guo N, Yang T, Yan J, Wang W, Li X.** The Potential Mechanisms by which Artemisinin and Its Derivatives Induce Ferroptosis in the Treatment of Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2022 Jan 4; 2022:1458143.
2. **Kannan R, Kumar K, Sahal D, Kukreti S, Chauhan VS.** Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. *Biochem J* 2005 Jan 15; 385(Pt 2): 409-418.
3. **Li J, Cao F, Yin H, et al.** Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020; 11: 88.
4. **Mwangi S, Abuga K, Mungai N, Mwangi J.** A High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Artemisinin in *Artemisia annua* L. Leaf Extracts. *East Cent Afr J Pharm Sci* 2020; 23(2): 48-53.
5. **Peerzade SAMA, Makarova N, Sokolov I.** Ultrabright Fluorescent Silica Nanoparticles for Multiplexed Detection. *Nanomaterials (Basel)* 2020 May 8; 10(5): 905.
6. **Wang B, Hou D, Liu Q, Wu T, et al.** Artesunate sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin by downregulating RAD51. *Cancer Biol Ther* 2015; 16(10): 1548-56.
7. **Waseem Y, Hasan CA, Ahmed F.** Artemisinin: A Promising Adjunct for Cancer Therapy. *Cureus* 2018 Nov 23; 10(11): e3628.
8. **Zhou C, Pan W, Xiao PW, and Tong SC.** Artesunate induces apoptosis via a Bak-mediated caspase-independent intrinsic pathway in human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Physiol* 2012 Dec; 227(12): 3778-3786.