

7 日 GnRHa 短方案对卵泡液中 IGF-II 和 IGFBP-4 浓度的影响

张建梅, 李艳萍, 刘景, 刘冬娥, 刘能辉, 陈仙花

(中南大学湘雅医院妇产科生殖中心, 长沙 410078)

[摘要] 目的:探讨7日促性腺激素释放激素激动剂(gonadotropin releasing hormone agonist, GnRHa)短方案与GnRHa长方案对卵泡液中胰岛素样生长因子-II(insulin-like growth factor II, IGF-II)和胰岛素样生长因子结合蛋白-4(insulin-like growth factor binding protein-4, IGFBP-4)浓度水平的影响。方法:将接受体外受精-胚胎移植(in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET)治疗的88例输卵管因素不孕患者,随机分成7日GnRHa短方案组和GnRHa长方案组($n=44$)。收集取卵日优势卵泡的卵泡液,采用放射免疫法测定IGF-II浓度,酶联免疫吸附法测定IGFBP-4浓度。结果:7日GnRHa短方案与长方案组相比较,Gn用量明显减少,用药时间明显缩短。两组间人绒毛膜促性腺激素(hCG)注射日血清雌二醇(E_2)和每成熟卵泡 E_2 的水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。7日GnRHa短方案卵泡液的IGF-II和IGFBP-4水平明显低于GnRHa长方案组。两组间卵泡液的IGF-II/IGFBP-4比值差异无统计学意义($P>0.05$)。卵泡液中的IGF-II水平与Gn用量呈显著正相关。结论:7日GnRHa短方案与长方案引起卵泡液中IGF-II和IGFBP-4的浓度变化,但卵泡液中IGF-II和IGFBP-4浓度的改变并未导致临床结局的不同。

[关键词] 促性腺激素释放激素激动剂; 短方案; 长方案; 控制性促排卵; IGF-II; IGFBP-4
[中图分类号] R711.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2009)03-0190-05

Effect of 7-day gonadotropin-releasing hormone agonist protocol on IGF-II and IGFBP-4 levels in the follicular fluid

ZHANG Jianmei, LI Yanping, LIU Jing, LIU Dong'e, LIU Nenghui, CHEN Xianhua

(Reproductive Center, Department of Obstetrics and Gynaecology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract: **Objective** To explore the different effect of short 7-day gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) protocol and GnRHa long protocol on the insulin-like growth factor II (IGF-II) and insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) levels in follicular fluid. **Methods** Eighty-eight infertile patients due to tubal factors were included in this study. They were randomly divided into a short 7-day GnRHa protocol group and a GnRHa long protocol group ($n=44$). Follicular fluid was obtained from dominant follicles during oocyte retrieval. Levels of IGF-II and IGFBP-4 in the follicular fluid were detected by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay respectively. **Results** Duration of controlled ovarian stimulation was significantly shorter and the injected dosages of gonadotropin were significantly lower in the short 7-day protocol group. The differences in serum levels of estradiol and estradiol per mature follicle on the day of human chorionic gonadotropin injection between the two groups were not significant. The concentrations of IGF-II and IGFBP-4 in the follicular fluid of the short 7-day protocol group were significantly low-

收稿日期 (Date of reception) 2008-06-29

作者简介 (Biography) 张建梅(1979—),女,湖南怀化人,硕士,主治医师,主要从事妇产科生殖方面的研究。现在长沙市妇幼保健院妇产科生殖中心工作。

通讯作者 (Corresponding author) 李艳萍, E-mail: lisyanping@sina.com

er, while the difference of the ratio of IGF-II/IGFBP-4 between the two groups was not significant. Linear correlation analysis showed that IGF-II level in the follicular fluid was positively correlated to the total dose of gonadotropin. **Conclusion** The short 7-day and long GnRH_a protocols may affect the concentrations of IGF-II and IGFBP-4 in the follicular fluid. However, changes of IGF-II and IGFBP-4 concentrations do not contribute to different clinical outcomes.

Key words: gonadotropin-releasing hormone agonist; short protocol; long protocol; controlled ovarian stimulation (COS); IGF-II; IGFBP-4

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2009, 34(3):0190-05]

胰岛素样生长因子-II (insulin-like growth factor II, IGF-II) 和胰岛素样生长因子结合蛋白-4 (insulin-like growth factor binding protein-4, IGFBP-4) 在卵泡发育和胚胎发育中起重要的自分泌和旁分泌的调节作用^[1-2]。卵泡内微环境的改变可直接或间接影响卵母细胞的发育潜能, 从而影响卵子受精、卵裂、胚胎发育和妊娠结局^[3]。目前国内尚无 7 日促性腺激素释放激素激动剂 (gonadotropin releasing hormone agonist, GnRH_a) 短方案与长方案对卵泡内微环境影响的报道, 本研究旨在探讨 7 日 GnRH_a 短方案与长方案对卵泡液中 IGF-II 和 IGFBP-4 水平的影响。

1 对象与方法

1.1 研究对象

选取 2007 年 7 月至 10 月在湘雅医院生殖中心因输卵管因素不孕行体外受精-胚胎移植 (in vitro fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 治疗的患者 88 例, 同期随机分为 7 日 GnRH_a 短方案组和长方案组。纳入标准: 年龄 < 35 岁, 体质指数 (body mass index, BMI) 18 ~ 29 kg/m², 月经周期规律 (25 ~ 35 d), 能自发排卵; 子宫无异常, 双侧卵巢存在; 男方精子质量可行 IVF 受精。排除标准: 多囊卵巢综合征、子宫内膜异位症、严重男性因素需行卵母细胞胞浆内单精子注射术 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 者; 有系统性疾病, 内分泌或代谢不正常; 近 3 月有激素治疗史; 既往有放、化疗, 吸烟, 麻醉药品依赖者。研究对象均知情同意, 研究方案符合人体试验伦理学标准, 并得到湘雅医院生殖中心伦理委员会的批准。

1.2 控制性促排卵治疗

1.2.1 7 日 GnRH_a 短方案

从月经周期第 2 天开始给予 GnRH_a (达必佳,

德国辉凌制药有限公司) 0.1 mg 皮下注射每日 1 次, 第 3 天开始用促性腺激素 (gonadotropin, Gn) 促卵泡发育, 月经第 8 天停用达必佳。

1.2.2 GnRH_a 长方案

自使用促性腺激素前 1 周期的黄体中期 (即月经周期第 21 天) 用 GnRH_a (达菲林, 法国博福-益普生制药有限公司) 1.88 mg 肌注 1 次, 当月经第 3 天血卵泡刺激素 (follicle stimulation hormone, FSH)、黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)、雌二醇 (estradiol, E₂) 水平及 B 超监测提示垂体达到去敏感状态 (FSH < 5 U/L, LH < 5 U/L, E₂ < 50 pg/mL, 子宫内膜厚度 < 5 mm), 于月经第 3 天用 Gn 促卵泡发育。

两组 Gn 均为人基因重组促卵泡激素 (r-FSH, Gona-F 75 U/支, 瑞士 Serono), 剂量根据患者年龄、体质量、卵巢反应确定, 通常剂量为 150 ~ 225 U/d, 自月经第 6 天起 B 超监测卵泡及内膜发育并调整 Gn 剂量, 当优势卵泡直径 < 14 mm 隔日 B 超监测卵泡发育调整用量; 当优势卵泡直径达 14 mm 开始监测尿 LH 值并每日 B 超检查, 当有 1 ~ 2 个卵泡直径 ≥ 18 mm 或 2 ~ 3 个 ≥ 16 mm 时停用 Gn, 并抽血测 LH, E₂, 孕激素 (progesterone, P) 水平, 当晚 8:00 肌注人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 5 000 ~ 10 000 U, 于注射 hCG 后 36 h 左右行经阴道 B 超引导下采卵术。取卵、体外受精、胚胎培养均按湘雅医院生殖中心常规方法进行^[4]。采卵后予黄体酮 80 mg 肌注支持黄体功能, 移植受精 48 ~ 72 h 胚胎 2 ~ 3 枚, 移植后 12 ~ 16 d 验尿 hCG 或抽血查 hCG 以确定有无妊娠, 对 hCG 阳性患者于行移植后 4 ~ 5 周行 B 超检查, 对有孕囊或发生流产、异位妊娠, 经病理检查证实为妊娠者, 确诊为临床妊娠^[5]。所有病例移植后均随访。

1.3 卵泡液标本采集及保存

在取卵日, 阴道 B 超引导下取卵时留取第 1 管清亮、无血污染的、卵泡直径 > 17 mm 含有卵子的卵

泡腔的卵泡液 5 mL, 卵泡液均以 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液, 入无菌试管, 置于 -70 °C 冰箱中保存待测^[6]。

1.4 卵泡液 IGF-II 和 IGFBP-4 浓度测定

采用放射免疫法检测卵泡液 IGF-II 浓度, 试剂盒购自北京普尔伟业生物科技有限公司, 灵敏度 < 0.1 ng/mL, 批内变异系数 < 10%, 批间变异系数 < 15%。采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测卵泡液 IGFBP-4 浓度, 试剂盒购自美国 R&D 公司, 灵敏度为 250 pg/mL, 板内变异系数 < 10%, 板间变异系数 < 15%。所有操作均严格按试剂盒说明进行。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件。计量资料比较采用独立样本 *t* 检验, 计数资料比较采用 χ^2 检验。两个变量间的相关分析, 采用 Pearson 相关系数, 进行直线相关分析。假设检验水准定为双侧 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者一般情况的比较

表 1 两组患者的基本情况 ($\bar{x} \pm s, n = 44$)

Tab.1 Demographics and baseline characteristics of patients in the study ($\bar{x} \pm s, n = 44$)

组别	年龄(岁)	不孕年限(年)	BMI(kg/m ²)	窦卵泡数(个)	血清性激素基础水平		
					FSH(U/L)	LH(U/L)	E ₂ (pg/mL)
7日 GnRHa 短方案组	30.09 ± 2.42	5.06 ± 3.13	21.09 ± 2.49	7.50 ± 2.26	6.11 ± 1.48	4.65 ± 1.95	35.54 ± 18.21
GnRHa 长方案组	30.95 ± 2.01	5.32 ± 3.37	21.12 ± 2.15	8.05 ± 2.61	6.09 ± 1.25	5.35 ± 1.53	36.06 ± 23.91

表 2 两组患者 Gn 用药与 hCG 日血清性激素水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 44$)

Tab.2 Comparison of Gn ampoules and serum hormone concentrations on the day of hCG injection between the two groups ($\bar{x} \pm s, n = 44$)

组别	Gn 用药时间(d)	Gn 用量(U)	hCG 日血清性激素水平			
			LH(U/L)	E ₂ (U/L)	每卵子 E ₂ (pg/mL)	每成熟卵泡 E ₂ (pg/mL)
7日 GnRHa 短方案组	8.80 ± 1.41 *	1 759.38 ± 551.69 *	1.26 ± 2.06	3 258.20 ± 2 517.04	219.76 ± 126.19	386.18 ± 249.44
GnRHa 长方案组	11.50 ± 1.21	2 692.61 ± 743.22	0.86 ± 0.62	3 205.32 ± 1 575.13	225.85 ± 98.41	395.18 ± 138.94

与 GnRHa 长方案组比较, * $P < 0.05$ 。

表 3 两组患者促排卵结果及妊娠情况的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 44$)

Tab.3 Comparison of outcomes of controlled ovarian stimulation and pregnancy between the two groups ($\bar{x} \pm s, n = 44$)

组别	获卵数(个)	受精率(%)	卵裂率(%)	优质胚胎率(%)	妊娠率(%)	早期流产率(%)
7日 GnRHa 短方案组	15.07 ± 7.16	76.21 ± 20.37	93.28 ± 15.73	64.93 ± 22.84	47.73(21/44)	4.76(1/21)
GnRHa 长方案组	15.14 ± 7.77	78.77 ± 15.60	96.32 ± 6.75	62.47 ± 20.00	54.55(24/44)	16.67(4/24)

两组均无取消周期。两组患者间年龄、BMI、不孕年限、窦卵泡数、血清性激素(FSH, LH, E₂)基础水平差异均无统计学意义($P > 0.05$), 提示两组具有可比性(表 1)。

2.2 两组患者 hCG 日血清性激素水平比较

7日 GnRHa 短方案组的平均 Gn 用药时间和用量明显少于 GnRHa 长方案组($P < 0.05$)。两组间 hCG 日血清 LH 和 E₂ 水平、每卵子和每成熟卵泡(卵泡直径 ≥ 14 mm)的 E₂ 水平, 差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表 2)。

2.3 两组患者促排卵结果及妊娠情况的比较

7日 GnRHa 短方案组与 GnRHa 长方案组的平均获卵数、受精率、卵裂率、优质胚胎率、妊娠率和早期流产率相似, 差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表 3)。

2.4 两组患者卵泡液中 IGF-II 及 IGFBP-4 浓度的比较

7日 GnRHa 短方案组卵泡液中 IGF-II 及 IGFBP-4 浓度明显低于 GnRHa 长方案组($P < 0.05$), 而两组卵泡液中 IGF-II/IGFBP-4 值差异无统计学意义($P > 0.05$, 表 4)。

表 4 两组患者卵泡液中 IGF-II 及 IGFBP-4 浓度的比较($\bar{x} \pm s, n=44$)Tab. 4 Comparison of follicular fluid concentrations of IGF-II, IGFBP-4 and their ratio between the two groups ($\bar{x} \pm s, n=44$)

组别	IGF-II (ng/mL)	IGFBP-4 (pg/mL)	IGF-II/IGFBP-4
7 日 GnRH _a 短方案组	0.17 ± 0.06 *	2 915.48 ± 1 443.02 *	0.07 ± 0.04
GnRH _a 长方案组	0.20 ± 0.07	3 646.64 ± 1 818.67	0.07 ± 0.03

与 GnRH_a 长方案组比较, * $P < 0.05$ 。

2.5 卵泡液中 IGF-II 水平与 Gn 用量的关系

卵泡液中 IGF-II 水平与 Gn 用量呈显著正相关, 回归方程 $\hat{Y} = 0.127 + 0.0000263 X$ ($r = 0.316$, $P < 0.05$), 随 Gn 用量增加, IGF-II 呈上升趋势 (图 1)。

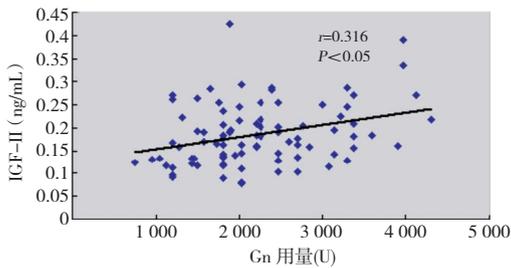


图 1 卵泡液 IGF-II 浓度与 Gn 用量的相关趋势图。

Fig. 1 Correlation between follicular fluid concentrations of IGF-II and Gn ampoules.

3 讨 论

研究发现, 生殖器官(卵巢、子宫、胎盘)均有 GnRH 和 GnRH-R 的表达^[7-8]。Peng 等^[9]研究发现, 外源性 GnRH 可自发调节人卵巢颗粒细胞上的 GnRH mRNA 的水平, 正向调节 GnRH-R 基因的表达, 而 hCG 下调 GnRH-R 基因的表达。GnRH 能激活人颗粒-黄体细胞的促有丝分裂原活化蛋白激酶, 发挥自分泌因子的作用^[10]。GnRH_a 对人黄素化颗粒细胞增殖的直接抑制作用呈时间和剂量依赖性^[11]。因此推测在不同月经周期使用不同剂量的 GnRH_a 可能干扰生殖组织细胞内 GnRH 的自分泌和旁分泌信号, 从而影响卵泡的发育、胚胎的种植和发育, 导致不同的 IVF 结局。

卵泡液中 IGF-II 主要来源于颗粒细胞, IGF-II 是人卵泡中最主要的胰岛素样生长因子, 能刺激卵巢颗粒细胞增殖, 并可通过自分泌方式协同 FSH 增强颗粒细胞 P450 芳香化酶的表达和活性, 促进雄烯二酮在颗粒细胞内转化为 E₂。在卵泡选择时, 雌激素主导的优势卵泡内 IGF-II 合成

急剧增加, 对优势卵泡发育有重大作用^[1]。IGFBP-4 是一种低分子质量的 IGFBP, 与 IGF-II 亲和力高, 其与 IGF-II 结合, 可减少游离的 IGF-II, 对调节卵泡内游离的 IGF 生物活性起重要作用。因而, 卵泡液中 IGF-II 和 IGFBP-4 的变化将间接影响卵泡的发育。

本研究中发现 GnRH_a 长方案组的 Gn 用量、卵泡液中 IGF-II 和 IGFBP-4 浓度明显高于 7 日 GnRH_a 短方案, 而两组的获卵数、每成熟卵泡的 E₂ 水平和 IGF-II/IGFBP-4 值差异均无统计学意义。大量外源性的 Gn 作用于卵巢, 可促使更多的卵泡生长, 但两组的获卵数却相似, 其原因可能是长方案组高浓度水平的 IGFBP-4 与 IGF-II 结合后, 降低了游离的 IGF-II 浓度水平, 抑制了 IGF-II 生物活性的发挥, 即 IGF-II 和 IGFBP-4 的这种相对稳态导致了两组 hCG 日血清 E₂ 及每成熟卵泡的 E₂ 水平无明显差异, 因而 7 日 GnRH_a 短方案组与 GnRH_a 长方案组的优势卵泡的雌激素合成差异无统计学意义, 从而使生长的卵泡得以正常发育。

卵母细胞的成熟受到各种类固醇激素及诸多细胞因子的调节。由于卵丘复合物在整个成熟过程中始终浸在卵泡液中, 因此卵泡微环境是决定卵母细胞发育的关键因素。Lighten 等^[12]用 RT-PCR 检测发现, IGF-II, IGF-IR 和 IGF-IIR 在卵母细胞和着床前胚胎中均有 mRNA 表达, 推测 IGF-II 能促进卵母细胞的发育, 提高卵母细胞的成熟度、受精力及卵裂率。本研究发现, 7 日 GnRH_a 短方案组的成熟卵子数、受精率、卵裂率和优胚率与 GnRH_a 长方案组差异无统计学意义, 与 Hazout 等^[13]的报道一致, 其原因可能是两组卵泡液中游离的 IGF-II 的生物活性无差异。可推测 7 日 GnRH_a 短方案与 GnRH_a 长方案在控制性促排卵治疗中虽导致了卵泡微环境内 IGF-II 和 IGFBP-4 水平的不同, 但未影响游离 IGF-II 的生物活性, 因而两组间的卵子质量和胚胎质量无显示

差异。

Ramasharma 等^[14]研究表明,在体外无血清条件下培养的人卵巢颗粒细胞也能显著分泌 IGF-II,培养液内分别加入 hCG, FSH, LH 后,可刺激颗粒细胞分泌 IGF-II 的量明显增加,且呈剂量依赖性。本研究发现,控制性促排卵治疗取卵日人体卵泡液中 IGF-II 水平与使用促排卵的外源性 Gn 剂量之间呈明显正相关 ($r = 0.316, P < 0.05$),随 Gn 用量增加,IGF-II 水平呈上升趋势,推测 GnRHa 长方案组卵泡液的 IGF-II 水平较 7 日 GnRHa 短方案组高的原因可能与长方案组的外源性 Gn 用量较多有关。

在控制性促排卵过程中,卵泡内微环境发生了改变。卵泡在外源性 Gn 的刺激下可分泌不同的激素、生长因子和细胞因子,都可直接或间接影响卵子的质量和发育潜能。已有报道证实卵泡液中的 E_2 、瘦素、抑制素、血管内皮生长因子等都可影响卵泡的发育^[15-16]。本研究仅研究卵泡液中的 IGF-II 和 IGFBP-4,对其他的生长因子和细胞因子的影响有待今后进一步研究。

致谢:衷心感谢湘雅医院妇产科生殖医学中心李玉梅主治医师、周庆娥副主任技师、王蕾技师,中国国家遗传重点实验室试管婴儿技术组姚仲元、张叶青以及本研究所涉及的患者对实验标本收集给予的帮助!

参考文献:

- [1] Giudice L C. Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function [J]. *J Soc Gynecol Investig*, 2001, 8(1 Suppl Proceedings): S26-S29.
- [2] Rappolee D A, Sturm K S, Behrendtsen O, et al. Insulin-like growth factor II acts through an endogenous growth pathway regulated by imprinting in early mouse embryos [J]. *Genes Dev*, 1992, 6(6): 939-952.
- [3] 庄广伦. 现代辅助生殖技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 30-39.
ZHUANG Guanglun. Advanced assisted reproductive techniques [M]. People's Medical Publishing House, 2005: 30-39.
- [4] 李艳萍, 卢先艳, 刘冬娥, 等. 体外受精-胚胎移植 412 个周期分析 [J]. *生命科学研究*, 2004, 8(1): 76-81.
LI Yanping, LU Xianyan, LIU Dong'e, et al. Analysis of 412 Cycles of IVF-ET and ICSI [J]. *Life Science Research*, 2004, 8(1): 76-81.
- [5] 周灿权, 钟依平, 庄广伦, 等. 影响体外受精-胚胎移

- 植妊娠的相关因素分析 [J]. *中华妇产科杂志*, 2002, 37(12): 749-750.
ZHOU Canquan, ZHONG Yiping, ZHUANG Guanglun, et al. Analysis of affect IVF-ET of pregnancy-related factors [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2002, 37(12): 749-750.
- [6] Smits J, Andersen A N, Devroey P, et al. Endocrine profile in serum and follicular fluid differs after ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH in IVF patients [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(3): 676-687.
- [7] Kakar S S, Musgrove L C, Devor D C, et al. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 189(1): 289-295.
- [8] Ortman O, Diedrich K. Pituitary and extrapituitary actions of gonadotrophin-releasing hormone and its analogues [J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(Suppl 1): 194-206.
- [9] Peng C, Fan N C, Ligier M, et al. Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells [J]. *Endocrinology*, 1994, 135(5): 1740-1746.
- [10] Kang S K, Tai C J, Cheng K W, et al. Gonadotropin-releasing hormone activates mitogen-activated protein kinase in human ovarian and placental cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 170(1-2): 143-151.
- [11] Kang S K, Choi K C, Cheng K W, et al. Role of gonadotropin-releasing hormone as an autocrine growth factor in human ovarian surface epithelium [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(1): 72-80.
- [12] Lighten A D, Hardy K, Winston R M, et al. Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47(2): 134-139.
- [13] Hazout A, de Ziegler D, Cornel C, et al. Comparison of short 7-day and prolonged treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist desensitization for controlled ovarian hyperstimulation [J]. *Fertil Steril*, 1993, 59(3): 596-600.
- [14] Ramasharma K, Li C H. Human pituitary and placental hormones control human insulin-like growth factor II secretion in human granulosa cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(9): 2643-2647.
- [15] Dorn C, Reinsberg J, Kupka M, et al. Leptin, VEGF, IGF-1, and IGFBP-3 concentrations in serum and follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2003, 268(3): 187-193.
- [16] Andersen C Y, Byskov A G. Estradiol and regulation of anti-Müllerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(10): 4064-4069.