

文章编号:1003-2754(2025)08-0746-04

doi:10.19845/j.cnki.zfysjbbzz.2025.0142



短篇与个案报告

单纯疱疹病毒性脑炎继发抗 mGluR5 脑炎 1 例报告并文献复习

林福虹, 赵伟丽, 李国丽, 芦 军, 周建宇

摘要: 抗代谢型谷氨酸受体 5(mGluR5)脑炎是临床上比较罕见的一种自身免疫性脑炎,本文回顾性分析 1 例继发于单纯疱疹病毒性脑炎(HSE)的抗 mGluR5 脑炎患者的临床资料,并结合国内外数据库中已报道的 39 例抗 mGluR5 脑炎患者的临床资料进行汇总分析,探讨抗 mGluR5 脑炎患者临床特点并结合相关文献复习总结抗 mGluR5 脑炎最新研究进展,旨在增加临床医生对抗 mGluR5 脑炎这一罕见病的认识。

关键词: 抗代谢型谷氨酸受体 5 脑炎; 单纯疱疹病毒性脑炎; 自身免疫性脑炎

中图分类号: R512

文献标识码: A

Anti-metabotropic glutamate receptor encephalitis secondary to herpes simplex virus encephalitis: A case report and literature review LIN Fuhong, ZHAO Weili, LI Guoli, et al. (Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Chifeng University, Chifeng 024000, China)

Abstract: Anti-metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) encephalitis is a rare form of autoimmune encephalitis in clinical practice. This article reviews the clinical data of a patient with anti-mGluR5 encephalitis secondary to herpes simplex virus encephalitis (HSE) and summarizes the clinical data of 39 patients with anti-mGluR5 encephalitis from domestic and international databases. This article discusses the clinical features of patients with anti-mGluR5 encephalitis and conducts a literature review to summarize the latest research advances in anti-mGluR5 encephalitis, in order to improve the understanding of this rare disease among clinicians.

Key words: Anti-metabotropic glutamate receptor 5 encephalitis; Herpes simplex virus encephalitis; Autoimmune encephalitis

在以往的研究中,单纯疱疹病毒性脑炎(herpes simplex virus encephalitis, HSE)继发自身免疫性脑炎最常见的类型是抗 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR)脑炎^[1]。本研究报告 1 例由 HSE 继发的抗 mGluR5 脑炎(metabotropic glutamate receptor 5, mGluR5)患者并对其深入分析,结合文献对抗 mGluR5 脑炎的临床表现、辅助检查及治疗反应进行讨论和总结,以期提高临床医生对该病的认识,为临床提供借鉴参考。

1 病例资料

患者,男,53 岁,高中文化。主因“反复抽搐、精神行为异常 2 月”入院,患者于 2021 年 12 月 9 日无明显诱因出现周身乏力,次日出现腹泻,水样便,2 d 后出现发热,体温最高达 39.4℃,伴恶心呕吐多次,并出现发作性意识丧失伴抽搐发作 2 次,表现为突发意识丧失,头向右侧偏斜,双眼向右侧凝视,四肢强直阵挛,症状持续约 1 min 缓解,当地医院完善头颅 MRI 示左侧颞叶及岛叶异常信号(见图 1)。12 月 13 日出现意识模糊,胡言乱语,躁动不安,答非所问。12 月 14 日急转院至(赤峰学院附属医院,以下简称“我院”),完善腰椎穿刺,脑脊液压力 170 mmH₂O,脑脊液白细胞 155×10⁶/L,单核细胞 95%,糖 4.6 mmol/L(同步血糖 9.4 mmol/L),氯 115 mmol/L,蛋白 2 519 mg/L,给予丙戊酸钠注射液微量泵入抗癫痫、阿昔洛韦注射液(0.75 g,3 次/d)抗病毒,外送病原微

生物高通量基因检测回报:HSV I 型序列数 15 197,人类疱疹病毒 4 型序列数 10,结核分枝杆菌及利福平耐药基因检测阴性。外送北京某医院应用转染细胞法(CBA 法)测血清及脑脊液抗 NMDAR、γ-氨基丁酸 A/B 受体(GABAA/BR)、接触蛋白相关蛋白-2(CASPR-2)、富含亮氨酸胶质瘤失活 1 蛋白(LGI1)、α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异噻唑丙酸受体(AMPA)抗体均阴性。测血清及脑脊液水通道蛋白 4(aquaporin 4, AQP4)-IgG、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(myelin oligodendrocyte glyco-protein, MOG)-IgG 均阴性。结核感染 T 细胞斑点试验(T-SPOT. TB)阳性,结核菌素试验(PPD 试验)阴性,考虑不排除结核潜伏感染,加用异烟肼 0.6 g,1 次/d,吡嗪酰胺 0.5 g,3 次/d,利福平 0.9 g,1 次/d 抗结核,并同时应用免疫球蛋白 0.4 g/kg 静脉滴注 5 d,地塞米松 15 mg,1 次/d×8 d,10 mg,1 次/d×5 d,5 mg,1 次/d×3 d,序贯泼尼松片口服 30 mg 1 次/d,3 d 减 1 片直至停用。1 月 12 日复查腰椎穿刺,脑脊液压力 100 mmH₂O,脑脊液白细胞 21×10⁶/L,单核细胞 99%,糖 3.65 mmol/L(同步血糖 6.85 mmol/L),氯 130 mmol/L,蛋白 2 756 mg/L。患

收稿日期:2024-03-15;修订日期:2024-07-20

基金项目:内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY23044);赤峰学院附属医院内科研项目(FSYY2022-13)

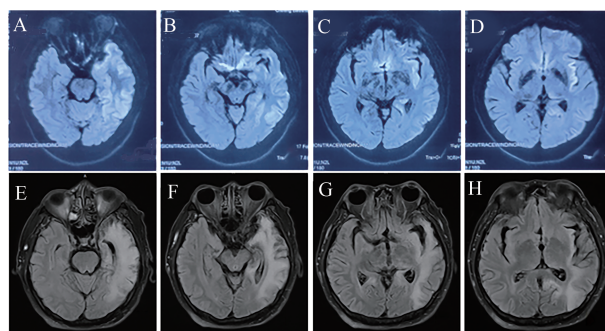
作者单位:(赤峰学院附属医院神经内科,内蒙古 赤峰 024000)

通信作者:赵伟丽, E-mail:wlzhao1968@163.com

者住院期间合并心力衰竭、肺部感染、泌尿道感染、肝功能异常,给予抗病毒、抗结核、抗炎、补充白蛋白、利尿、保肝、营养支持等对症支持治疗后好转,1月30日办理出院,患者出院时高级智能下降较前明显好转,可认识家人,简单问题可正确回答,无躁动不安,无抽搐发作,出院后继续口服左乙拉西坦0.5 g、2次/d抗癫痫,奥氮平10 mg、1次/d,继续口服保肝药物。患者于2022年2月14日再次出现不认识家人,不穿衣服外出,发作性抽搐,双眼向上凝视、左侧面部及口角抽搐,时有胡言乱语,问话不能正确对答,不能遵嘱执行动作,再次就诊于我院。患者既往2型糖尿病病史16年,平素应用门冬胰岛素30注射液控制血糖,肥厚型梗阻性心肌病病史16年,运动耐力下降,走路时偶有胸闷气短。个人及家族史无特殊。

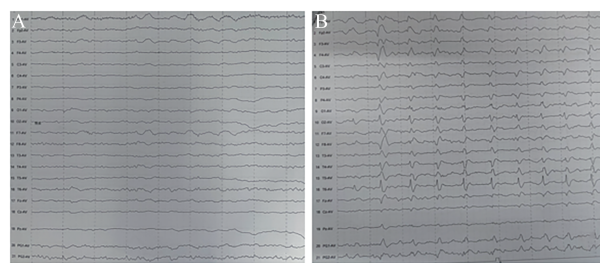
体格检查:生命体征平稳,双肺呼吸音粗,心脏可闻及收缩期杂音,腹软,无压痛,双下肢无水肿;神经系统:意识模糊状态,躁动不安,注意力不集中,答非所问,查体不合作,自知力缺乏,时间、地点、人物定向力下降,记忆力、理解力、判断力下降。双瞳孔等大正圆, $D=3.0\text{ mm}$,光反应灵敏,面纹对称,颈无抵抗,克氏征阴性,布氏征阴性。四肢均有自主活动,四肢腱反射对称引出,双侧病理征(-),余查体不合作。

辅助检查:常规化验指标-血常规、血沉、CRP正常,风湿免疫全套、免疫固定电泳、炎症指标、血清G试验、GM试验、TORCH全套、肿瘤标志物均正常,SPOT-TB阳性:结核特异性抗原A 7 IU/ml,结核特异性抗原B 19 IU/ml;甲状腺及全身淋巴结彩超未见异常,肝胆胰脾彩超:脾大,长12.7 cm,脾厚4.4 cm。胸部CT示双肺炎,双侧胸腔积液,心包积液,腹部及盆腔增强CT未见肿瘤性病变,患者拒绝行骨髓穿刺排除血液系统肿瘤可能。MoCA及MMSE评分不能配合。腰椎穿刺示脑脊液压力220 mmH₂O,脑脊液白细胞 $19\times 10^6/\text{L}$,单核细胞95%,糖4.64 mmol/L(同步血糖10.8 mmol/L),氯120.30 mmol/L,蛋白2 692 mg/L。脑脊液X-pert检测阴性。血和脑脊液布氏杆菌凝集试验阴性。外送北京某医院脑脊液和血常见的自身免疫性脑炎相关抗体(抗NMDAR、AMPA1、AMPA2、LGI1、CASPR2、GABABR、DPPX、LON5、GAD65)及副瘤性神经综合征抗体(Hu、Yo、Ri、Amphiphysin、Ma1、Ma2、CV2)均阴性。TORCH(脑脊液):单纯疱疹病毒1型IgG抗体阳性3.47;TORCH(血):单纯疱疹病毒1型IgG抗体阳性4.72。头部MRI示左颞叶、海马、海马旁回、枕叶、岛叶可见片状稍长 T_1 、稍长 T_2 信号,DWI序列局部可见稍高信号,FLAIR序列呈高信号(见图1)。视频脑电图示右侧后颞及后枕可见连续发放中等波幅尖波,双导呈针锋相对(见图2)。采用TBA筛查患者血清及脑脊液中潜在抗体,镜下见海马分子层神经毡荧光阳性,而海马颗粒细胞层无荧光,进一步采用CBA方法证实抗mGluR5-IgG阳性,血清1:10,脑脊液1:100。



A~D:患者发病初期头部FLAIR序列左侧颞叶及岛叶异常信号(2021年12月12日);E~H:患者第2次发病左颞叶、岛叶、海马及枕叶FLAIR序列高信号,脑沟裂增宽(2022年2月15日)。

图1 HSE继发抗mGluR5脑炎患者不同时期头部MRI资料



A:左额颞可见较多同步中高波幅1.5~2.5 CPS慢波(2022年1月17日);B:右侧后颞及后枕可见连续发放中等波幅尖波,双导呈针锋相对(2022年2月15日)。

图2 HSE继发抗mGluR5脑炎患者不同时期脑电图表现

诊断、治疗与随访 患者入院后予以甲强龙1 000 mg、1次/d冲击联合丙种球蛋白0.4 g/(kg·d)治疗5 d,序贯口服泼尼松60 mg、1次/d维持治疗并每周减量5 mg逐渐减停,并长期口服免疫抑制剂吗替麦考酚酯500 mg、2次/d预防复发,同时给予左乙拉西坦0.5 g、2次/d抗癫痫,奥氮平10 mg、1次/d改善精神症状,并给予抗炎、保肝、利尿等对症支持治疗。2个月后门复诊,患者未再出现幻觉、妄想,定向力、记忆力、判断力、理解力和计算力较前明显改善,能够完成简单家务,改良Rankin量表评分为2分。结合患者出现急性起病的精神行为异常及认知功能下降,脑脊液及血清抗mGluR5抗体阳性且对激素及免疫抑制剂治疗反应良好,最终确诊为抗mGluR5脑炎。

2 讨论

自2011年首次报道了抗mGluR5脑炎以来^[2],至今在国内外鲜有病例报道。谷氨酸受体分为离子通道型(iGluRs)和代谢型(mGluRs),前者为谷氨酸门控离子通道,后者是G蛋白偶联受体家族成员。代谢型谷氨酸受体迄今为止有8种不同类型,mGluR1-8^[3]。mGluR5主要分布在突触后膜,在中枢神经系统中广泛表达,主要分布在纹状体、大脑皮质、海马、基底节等区域^[4],血清中抗mGluR5抗体可与神经元表面mGluR5受体结合,使得突触间

隙中谷氨酸浓度增加,谷氨酸是中枢神经系统主要的兴奋性神经递质,在神经元功能中起至关重要的作用。然而,谷氨酸过量会导致大量神经元死亡,同时因谷氨酸受体过度激活而引起兴奋性毒性损

伤脑组织。近 10 年国内外共报道 39 例抗 mGluR5 脑炎^[5-17],结合本研究 1 例患者的临床信息,40 例抗 mGluR5 脑炎的临床特点、辅助检查、治疗及预后(见表 1)。

表 1 40 例抗 mGluR5 脑炎患者临床特征

临床特征	例数(n)	比例(%)	临床特征	例数(n)	比例(%)
发病年龄中位数(岁)	36		血清和脑脊液 mGluR5 抗体均呈阳性(配对样本)	26	65%
女性	17	42.5%	异常脑电图	16/37	43.2%
前驱症状	17	42.5%	头部 MRI 检查异常	33	82.5%
行为人格改变	28	70.0%	一线免疫治疗(IVMP、IVIG)	38	95%
认知缺陷	29	72.5%	二线免疫治疗(PTX、MMF)	7	17.5%
睡眠障碍	16	40.0%	合并自身免疫性疾病	2	5%
癫痫	20	50.0%	合并肿瘤	8	20%
癫痫持续状态	4	10.0%	何杰金病	6	15%
意识水平下降	12	30.0%	其他肿瘤	2	5%
运动障碍	6	15.0%	发病到最后一次随访的中位时间(月)	12	
通气不足	3	7.5%	完全恢复	10	25%
失语症	7	17.5%	部分恢复	30	75%
脑脊液白细胞数增多	21	52.5%	死亡	1	2.5%
脑脊液中 mGluR5 抗体阳性	31	77.5%	复发	4	10%
血清中 mGluR5 抗体阳性	35	87.5%			

40 例患者中 23 例(57.5%)为男性,这与主要发生在女性的抗 NMDAR 脑炎不同,各年龄段均可发病,中位年龄 36 岁(6~75 岁),青年居多。前驱症状很常见,40 例患者中有 17 例(43%)出现前驱症状,包括头痛、体重下降、流感样症状。最常见的临床表现为不同程度的认知障碍(29/40,73%)、精神行为异常(28/40,70%),癫痫发作(20/40,50%)、睡眠障碍(16/40,40%)、意识水平下降(12/40,30%)和运动障碍(6/40,15%)。其他不典型的症状包括脑神经麻痹、肌张力障碍、构音障碍、肢体无力、麻木、自主神经功能障碍和中枢性通气不足。5 例(12.5%)患者出现脑神经麻痹,其中面神经最常受累,其他脑神经麻痹包括动眼神经和迷走神经麻痹,3 例患者(7.5%)出现换气不足,急性期需要重症监护。既往研究表明,mGluR5 主要在中枢神经系统海马体和杏仁核外侧核中表达,mGluR5 是学习和记忆的核心结构,在抑制性学习中起着至关重要的作用,可解释其认知损害和癫痫发作的原因。由于抗 mGluR5 脑炎患者的临床症状和检查结果均缺乏特异性,临床医生很容易将其误诊为精神疾病。本例患者临床主要表现为认知障碍和精神行为异常,与国内外文献报道一致。

40 例患者中有 8 例(20%)合并肿瘤,肿瘤相关性在男女之间无显著性差异。文献报道西方 13 例抗 mGluR5 脑炎患者中有 7 例合并肿瘤,其中 6 例为霍奇金淋巴瘤,1 例为小细胞肺癌,在治疗肿瘤后得到改善^[2,6,9,10],中国 27 例患者中有 1 例合并成熟卵巢畸胎瘤(血清和脑脊液中 NMDAR 抗体也呈阳

性)。肿瘤的发生率远低于西方患者,可能与种族和部分患者的随访时间相对较短有关。本例患者经初步筛查未发现肿瘤,但考虑到有自身免疫性脑炎患者在长期随访中发现肿瘤的报告,仍需继续进行长期随访,定期筛查肿瘤。

21 例(52.5%)患者脑脊液出现白细胞数增多。部分患者出现寡克隆带或 IgG 指数升高。因此在脑脊液常规检查中表现正常,但疑似患者应筛查 mGluR5 抗体。本例患者脑脊液检查白细胞数及蛋白虽高,但较前下降,不考虑病毒性脑炎复发,多项病原学检查不支持细菌、结核、真菌感染可能。脑脊液中 mGluR5 抗体阳性,符合中国自身免疫性脑炎诊治专家共识(2022 年版)诊断标准,最终确诊为抗 mGluR5 脑炎。

33 例(83%)患者在发病或复发时出现了特定的脑 MRI 异常,主要表现为 T₂ FLAIR 序列异常信号,可累及边缘系统或其他区域,如丘脑、脑桥、额叶、顶枕部皮质及小脑。7 例(18%)患者 MRI 检查结果正常,提示抗 mGluR5 脑炎患者头部 MRI 可以正常。本例患者头部 MRI 异常,但考虑为前期病毒性脑炎损害所致。37 例患者完善了脑电图检查,16 例(43%)患者脑电图异常,表现为癫痫样放电或弥漫性慢波,提示抗 mGluR5 脑炎患者脑电图表现无显著特异性。本例患者的脑电图为右侧后颞及后枕可见连续发放中等波幅尖波,双导呈针锋相对(见图 2),亦不排除前期病毒性脑炎损害所致。

抗 mGluR5 脑炎患者对免疫治疗有良好的反应(见表 1),完全恢复 10 例(25%),部分恢复 30 例

(75%),提示治疗预后良好。1 例死亡,死亡率为 2.5%,与抗 NMDAR 脑炎的临床结果很接近^[18]。临床结果的不良预后因素是发作时的中枢性低通气和疾病高峰时较高的 mRS 评分。4 例(10%)患者出现了复发,他们复发时重新开始免疫治疗后都有了临床改善。

目前虽然没有随机对照试验确定抗 mGluR5 脑炎患者的最佳治疗方法,但大多数自身免疫性脑炎患者,对免疫治疗均有较好反应。一线免疫治疗(皮质类固醇、静脉丙种球蛋白)或联合二线免疫治疗(吗替麦考酚酯、利妥昔单抗)均能有效改善患者症状,对于伴发肿瘤的患者,切除肿瘤治疗可使预后更好^[11, 14]。临床医生须根据患者的具体情况和临床严重程度制定个体化的治疗方案。

根据《中国自身免疫性脑炎专家共识》指出,发现特异性抗体是自身免疫性脑炎的确证依据,目前, mGluR5 抗体一般还没有作为疑似自身免疫性脑炎的一线抗体检测。对于常见自身免疫性脑炎抗体和副肿瘤相关抗体阴性的高度疑似自身免疫性脑炎的患者,如果通过 TBA 检测到大鼠海马神经鞘的特定染色模式,则可以进行 mGluR5 抗体的筛查^[19]。笔者认为如在未经 TBA 筛查,仅根据有限商品化试剂盒的阴性结果,且未充分除外其他疾病的情况下,便贸然诊断“抗体阴性”自身免疫性脑炎是不合理的。

HSE 继发抗 NMDAR 脑炎的发病机制探讨表明,病毒感染损伤神经元并暴露位于神经元表面的 NMDAR 抗原,引发一系列自身免疫反应^[20]。鉴于 mGluR5s 在大脑中广泛存在,在抗 mGluR5 脑炎中发现神经元表面的 mGluR5 密度降低^[21],推测 HSE 后抗 mGluR5 脑炎的发病机制与抗 NMDAR 脑炎的发病机制相似。

综上所述,HSE 不但能够继发抗 NMDAR 脑炎,还可以继发抗 mGluR5 脑炎,临床上对急性或亚急性起病,以精神行为异常、认知功能下降、睡眠障碍及痫性发作等为主要症状的患者,在排除其他病因后需考虑抗 mGluR5 脑炎的可能,尽早完善血清及脑脊液 mGluR5 抗体检测并及时予以免疫治疗,同时进行全身肿瘤尤其淋巴瘤的筛查。

伦理学声明:本研究方案经赤峰学院附属医院伦理委员会审批(批号:fsyy2023015),患者均签署知情同意书

利益冲突声明:所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:林福虹负责文献收集、数据收集、绘制图片及撰写论文;李国丽、芦军、周建宇负责研究过程的实施;赵伟丽负责拟定写作思路、指导撰写论文并最后定稿。

【参考文献】

[1] Armangue T, Spatola M, Vlaga A, et al. Frequency, symptoms, risk factors, and outcomes of autoimmune encephalitis after herpes simplex encephalitis: A prospective observational study and retro-

spective analysis[J]. *Lancet Neurol*, 2018, 17(9): 760-772.

[2] Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Titulaer MJ, et al. Antibodies to metabotropic glutamate receptor 5 in the ophelia syndrome[J]. *Neurology*, 2011, 77(18): 1698-1701.

[3] Faas GC, Adwanikar H, Gereau RW 4th, et al. Modulation of pre-synaptic calcium transients by metabotropic glutamate receptor activation: A differential role in acute depression of synaptic transmission and long-term depression[J]. *J Neurosci*, 2002, 22(16): 6885-6890.

[4] Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, et al. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain[J]. *Neurosci Lett*, 1993, 163(1): 53-57.

[5] 梁艳琴,刘亢丁,周胜宇,等. 抗代谢性谷氨酸受体脑炎临床特点分析[J]. *中馈与神经疾病杂志*, 2024, 41(9): 822-828.

[6] Mat A, Adler H, Merwick A, et al. Ophelia syndrome with metabotropic glutamate receptor 5 antibodies in CSF[J]. *Neurology*, 2013, 80(14): 1349-1350.

[7] Prüss H, Rothkirch M, Kopp U, et al. Limbic encephalitis with mGluR5 antibodies and immunotherapy-responsive prosopagnosia[J]. *Neurology*, 2014, 83(15): 1384-1386.

[8] Juneja M, Kaur S, Mishra D, et al. Ophelia syndrome: Hodgkin lymphoma with limbic encephalitis[J]. *Indian Pediatr*, 2015, 52(4): 335-336.

[9] Guevara C, Farias G, Silva-Rosas C, et al. Encephalitis associated to metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) antibodies in cerebrospinal fluid[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2568.

[10] Spatola M, Sabater L, Planagumà J, et al. Encephalitis with mGluR5 antibodies: Symptoms and antibody effects[J]. *Neurology*, 2018, 90(22): e1964-e1972.

[11] 刘英北,陈运灿,吴洵昶. 儿童 mGluR5 自身免疫性脑炎(附 1 例报告及文献复习)[J]. *中国临床神经科学*, 2021, 29(6): 680-685.

[12] 郭昆典,林静芳,洪 楨. 抗 mGluR5 脑炎 1 例[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2021, 47(1): 44-47.

[13] 陈月秋,顾 昊,许利刚. 脑电图表现为 δ 刷的抗代谢型谷氨酸受体 5 脑炎 1 例[J]. *中华神经科杂志*, 2021, 54(2): 131-135.

[14] 冯基伦,程 璇,张海峰,等. 14 例抗代谢型谷氨酸受体 5 脑炎患者临床资料分析[J]. *中华神经医学杂志*, 2022, 21(2): 172-175.

[15] Chen S, Ren H, Lin F, et al. Anti-metabotropic glutamate receptor 5 encephalitis: Five case reports and literature review[J]. *Brain Behav*, 2023, 13(5): e3003.

[16] Guo K, Liu X, Gong X, et al. Autoimmune encephalitis with mGluR5 antibodies: A case series from China and review of the literature[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1146536.

[17] Sun Y, Tao JX, Han X, et al. Clinical features and brain MRI volumetric changes in anti-mGluR5 encephalitis[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2023, 10(8): 1407-1416.

[18] Gong X, Chen C, Liu X, et al. Long-term functional outcomes and relapse of anti-NMDA receptor encephalitis: A cohort study in Western China[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2021, 8(2): e958.

[19] 孙文琳,谢银银,彭婷婷,等. 自身免疫性脑炎急性症状性痫性发作和自身免疫相关性癫痫的诊治进展[J]. *中馈与神经疾病杂志*, 2024, 41(6): 515-520.

[20] Dalmau J, Graus F. Antibody-mediated encephalitis[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(9): 840-851.

[21] Maudes E, Mannara F, García-Serra A, et al. Human metabotropic glutamate receptor 5 antibodies alter receptor levels and behavior in mice[J]. *Ann Neurol*, 2022, 92(1): 81-86.

引证本文:林福虹,赵伟丽,李国丽,等. 单纯疱疹病毒性脑炎继发抗 mGluR5 脑炎 1 例报告并文献复习[J]. *中馈与神经疾病杂志*, 2025, 42(8): 746-749.