

先天性内耳畸形的影像学及听力学分析

周宝¹ 林少莲¹ 林有辉¹ 方哲明¹ 叶胜难¹ 张榕¹

[摘要] 目的:研究感音神经性聋患儿的颞骨影像学及听力学表现,分析内耳畸形的类型及其发生率。方法:对确诊为感音神经性聋患儿行颞骨 CT 和内耳水成像检查,对影像学及听力学表现进行回顾性分析。结果:590 例感音神经性聋患儿中 125 例(232 耳)存在内耳发育畸形。重度聋以上患耳的内耳畸形率约占 21.71%,中度聋以下患耳的内耳畸形率 12.85%。听力正常耳的内耳畸形率 13.59%。结论:颞骨 CT 及 MRI 检查对了解内耳畸形有重要意义。内耳畸形多为双侧,听力损失多为极重度,耳蜗前庭畸形、前庭水管扩大较为常见。感音神经性聋患儿中,重度聋以上患耳的内耳畸形率较中度聋以下患耳的内耳畸形率高,听力正常耳亦可存在内耳畸形。

[关键词] 感音神经性聋;内耳畸形;先天性;CT;MRI

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.22.005

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A

Imaging and audiology analysis of the congenital inner ear malformations

ZHOU Bao LIN Shaolian LIN Youhui FANG Zheming YE Shengnan ZHANG Rong
(Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, the First Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, 350005, China)

Corresponding author: YE Shengnan, E-mail: yeshengnan63@qq.com; ZHANG Rong, E-mail: zhang2012rong@sina.com

Abstract Objective: To investigate imaging and audiology features of temporal bone and analyze the classification and prevalence of inner ear abnormalities in children with sensorineural hearing loss. **Method:** Children who were diagnosed with sensorineural hearing loss were examined by high resolution CT and the inner ear fluid of MRI. And each chart was retrospectively reviewed to determine the imaging and audiology features. **Result:** There were 125 patients(232 ears) found with inner ear malformation in 590 children with SNHL. About 21.71% of the inner ear malformation occurred in severe and profound hearing loss ears, and 12.85% occurred in moderate hearing loss ears. The inner ear malformation rate in normal hearing ears were 13.59%. **Conclusion:** CT and MRI examinations of temporal bone are important diagnostic tools to identify inner ear malformations. Inner ear malformations are almost bilateral and hearing loss are profound. Cochleovestibular malformations and large vestibular aqueduct are the 2 most frequent deformities. Among the children with SNHL, deformity rate in the severe and profound hearing loss ears is higher than that in moderate hearing loss ear. Inner ear malformations can exist in people with normal hearing.

Key words sensorineural hearing loss; inner ear malformations; congenital;CT; MRI

内耳是听觉重要感受装置,若其中任何部分发生畸形,均有可能导致先天性感音神经性聋。文献报道,内耳的先天性畸形是儿童感音性聋(sensorineural hearing loss,SNHL)的常见病因^[1],其群体发病率为 1/2 000~1/6 000,其中约 20%为骨迷路畸形,约 80%为膜迷路畸形。本文选取 2010-01—2013-12 期间在我科行听力学检查后确诊为感音神经性聋的患儿 590 例,并行颞骨高分辨率 CT 和 MR 内耳水成像检查,对影像学及听力学表现进行回顾性分析。现将临床资料分析如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

590 例听力障碍儿童,包括:①出生后 3 d 和

42 d 听力筛查双耳或单耳 2 次均未通过的新生儿,于我院接受全面听力学检查;②因言语发育障碍而前来就诊的患儿。其中男 356 例,女 234 例;年龄 3 个月~8 岁 9 个月,平均 3.5 岁。

1.2 方法

1.2.1 听力学检查 对听力障碍儿童常规进行 ABR、耳声发射(OAE)、听觉多频稳态(ASSR)和声导抗检查。ABR 以波 V 反应阈 30 dBnHL 作为 2~4 kHz 范围听力正常的指标,以 V 波反应阈 > 30 dB 作为听力损失指标,听力损失分级如下:Ⅰ级(轻度),31~50 dBnHL;Ⅱ级(中度),51~70 dBnHL;Ⅲ级(重度),71~90 dBnHL;Ⅳ级(极重度),>90 dBnHL^[2]。

1.2.2 影像学检查 CT 采用 Toshiba 公司 Aquilion 多层螺旋 CT 行内耳横断面螺旋扫描。扫描范围以听眶线为基线,从乳突尖向上扫描至岩锥上缘。扫描层厚 1.0 mm,视野 20 cm,电压 120 kV,

¹福建医科大学附属第一医院耳鼻咽喉头颈外科(福州,350005)

通信作者:叶胜难,E-mail:yeshengnan63@qq.com;
张榕,E-mail:zhang2012rong@sina.cn

电流 230 mA。MRI 检查使用 GE Signa Excite TwinExct 1.5 超导型 MR 扫描仪,线圈为 8 通道相控阵头颅线圈,先行颞骨常规的横断 T₁WI、T₂WI、冠状抑脂 T₂WI 检查,再行内耳水成像 3D 序列扫描。将扫描所得原始图像,进行 MIP、MPR 及 VR 后处理获得清晰内耳图像。

影像学分析由 2 名影像专业医生进行,当意见不统一时,增加 1 名医师分析,并根据 Sennaroglu 等^[1]分类法对畸形的内耳进行分类。

听力学检查和影像学检查时对无法自然入睡的患儿给予水合氯醛 50 mg/kg 口服及苯巴比妥钠 4 mg/kg 肌内注射。

2 结果

2.1 影像学结果

CT 和 MRI 检查结果显示 590 例感音神经性聋患儿中 125 例(21.2%)存在内耳发育畸形,其中双侧内耳畸形 107 例(85.6%),单侧内耳畸形 18 例(14.4%),共 232 耳。

根据 Sennaroglu 等^[1]分类法,将内耳畸形分为 5 型。①耳蜗前庭畸形(图 1)41 例(75 耳),其中 Michel 畸形 2 例(2 耳);耳蜗发育不全 14 例(26 耳),其中 1 例伴有中耳及外耳畸形;不完全分隔 I

型(IP-I)8 例(15 耳);不完全分隔 II 型(IP-II),即 Mondini 畸形 17 例(32 耳)。②前庭畸形(图 2)51 例(95 耳),其中 12 耳不伴其它内耳畸形,83 耳同时伴有内耳其他畸形。③半规管畸形(图 2),73 例(127 耳),其中 58 耳不伴其他内耳畸形,69 耳同时伴有内耳其他畸形。④内耳道畸形(图 3)10 例(18 耳),表现为内耳道扩大 6 例(10 耳),细窄 4 例(8 耳)。其中 3 例(6 耳)内耳道细窄伴有位听神经细小、缺如。⑤前庭水管或蜗水管畸形 40 例(80 耳),均表现为前庭水管扩大(图 4),其中 52 耳不伴其他内耳畸形,28 耳同时伴有耳蜗发育不全、Mondini 畸形、前庭畸形、半规管畸形。在本组资料中未发现耳蜗未发育畸形、共同腔畸形及蜗水管畸形。耳蜗前庭畸形常伴有内耳其他部位的畸形,耳蜗前庭畸形中累及耳蜗、前庭、半规管、前庭水管、内耳道情况见表 1。

2.2 听力学结果

对 590 例感音神经性聋患儿的听力损失分级,结果见表 2。比较 590 例患儿不同程度听力损失的内耳畸形发生率,在重度聋以上患耳的内耳畸形率 21.71%,中度聋以下患耳的内耳畸形率 12.85%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。听力正

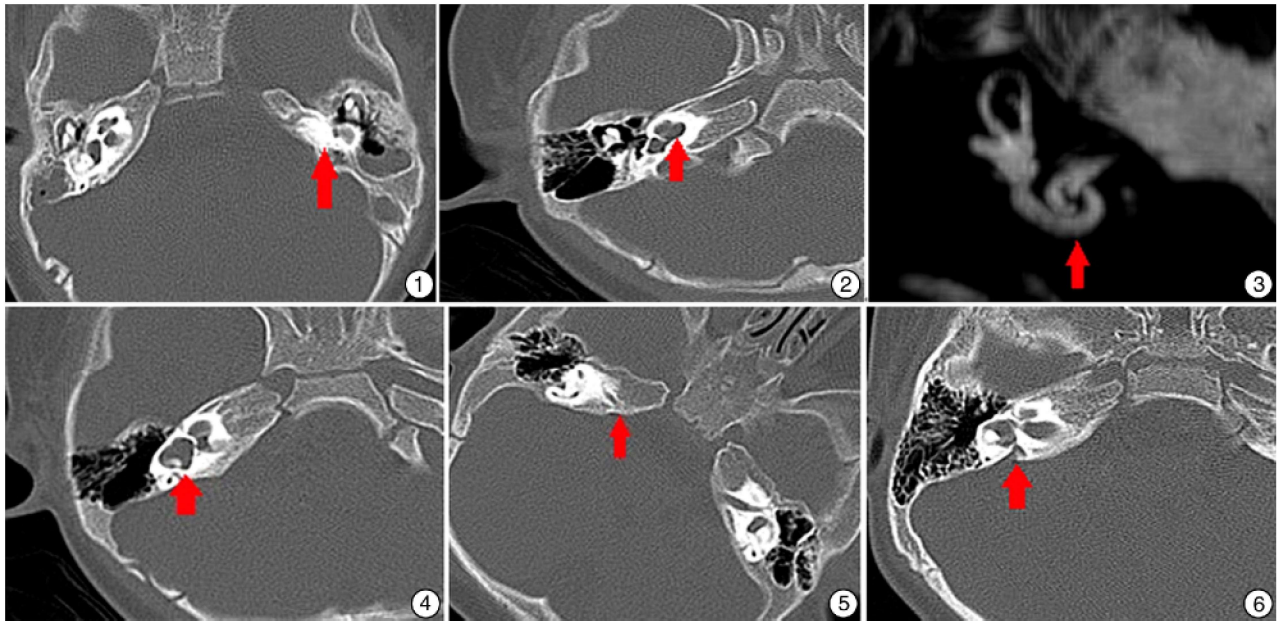


图 1 Michel 畸形,未见耳蜗、前庭结构; 图 2 耳蜗顶回与中回融合; 图 3 Mondini 畸形,耳蜗仅 1.5 圈; 图 4 前庭及半规管呈囊状,并融合; 图 5 内听道狭窄; 图 6 前庭水管扩大

表 1 耳蜗前庭畸形中累及耳蜗、前庭、半规管、前庭水管、内听道情况

例(耳)

类型	例数(耳数)	耳蜗	前庭	半规管	前庭水管	内听道
Michel 畸形	2(2)	2(2)	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)
耳蜗发育不全	14(26)	14(26)	9(17)	9(15)	4(8)	2(4)
IP-I	8(15)	8(15)	8(15)	8(15)	0(0)	1(2)
Mondini 畸形	17(32)	17(32)	13(24)	10(15)	6(12)	1(1)
总计	41(75)	41(75)	32(58)	27(45)	10(20)	4(7)

常耳的内耳畸形率 13.59%。

不同部位的内耳畸形引起的听力损失不同, 125 例(232 耳)内耳畸形的听力损失分布见表 3。

表 2 590 例感音神经性聋患儿的听力损失分级 耳

类型	内耳无畸形	内耳畸形	合计
极重度聋(>90 dB)	611	171	782
重度聋(71~90 dB)	92	24	116
中度聋(51~70 dB)	136	23	159
轻度聋(31~50 dB)	20	0	20
听力无异常	89	14	103
合计	948	232	1180

3 讨论

3.1 内耳畸形的影像学分类

由于影像诊断和临床需要,尤其是近年来内耳畸形患者人工耳蜗植入的开展,建立一种精简的内耳畸形分类尤为必要。但目前对内耳畸形的分类尚无统一的分类标准,人们普遍接受的是 1987 年由 Jackler 等提出的经典分类标准,但在 Jackler 分类中,Michel 畸形、共同腔畸形和耳蜗不完全分隔畸形只被归类为耳蜗畸形。然而在临床中发现,这些畸形影响的不仅是耳蜗,还常常伴有前庭的发育异常,例如 Michel 畸形代表无耳蜗及前庭,涉及了耳蜗与前庭两者的畸形;不完全分隔型常伴有前庭的扩大畸形,Sennaroglu 认为使用“耳蜗前庭畸形”似乎比“耳蜗畸形”更合适。因此 2002 年 Sennaroglu 等在 Jackler 的基础上提出了一种新的、更细致耳蜗前庭畸形的分类方法,2004 年又作了进一步说明^[1,3]。以下是根据 Sennaroglu 等分类方法将内耳发育畸形的影像学表现分别描述并讨论。

3.1.1 耳蜗前庭畸形 ①Michel 畸形:耳蜗和前庭结构完全缺失,占内耳畸形的不到 1%,影像学检查表现为无耳蜗、前庭等结构显示;本组中共发现 2 例(2 耳),约占 0.9%,患儿听力均为极重度聋;②耳蜗未发育:耳蜗完全缺失,前庭、半规管可正常或异常;③共同腔畸形:耳蜗和前庭未分化,融合呈一共同的囊腔,两者之间无任何分隔结构,常伴有半规管的异常;④耳蜗发育不全:表现为耳蜗分化,但

发育短小,耳蜗的高度<4 mm 或螺旋<2.5 周,底回正常亦可异常,中、顶回常融合,可见内阶间隔,发育不全的耳蜗像从内耳道发出的小芽孢,常伴有前庭扩大、半规管畸形;本组中共发现 14 例(26 耳),约占 11.2%;⑤不完全分隔 I 型(IP-I):表现为耳蜗呈一囊状结构,缺乏完整的蜗轴和筛区(耳蜗与内耳道间的区域),同时伴有一囊性扩张的前庭;本组中共发现 8 例(15 耳),约占 6.5%;⑥不完全分隔 II 型(IP-II):即 Mondini 畸形,表现为耳蜗呈 1.5 回,可有部分蜗轴和螺旋板,仅耳蜗底回正常,中回和顶回融合,部分伴有前庭扩大、前庭水管扩大及半规管异常。本组中共发现 17 例(32 耳),约占 13.8%。

在耳蜗前庭畸形中,Michel 畸形及耳蜗未发育少见,但却是内耳畸形中最严重的类型,其耳蜗的缺失是人工耳蜗植入术的绝对禁忌证。在本组资料中,耳蜗前庭畸形以 Mondini 畸形居多,此类畸形可通过人工耳蜗植入恢复听力,但常有报道^[4-5] Mondini 畸形在术中出现“井喷”及术后出现脑脊液鼻漏等并发症,手术时应特别注意。耳蜗畸形常同时伴有内耳其他部分的畸形,表 1 说明了耳蜗畸形中累及耳蜗、前庭、半规管、前庭水管、内听道的情况,其中以累积前庭、半规管常见。

3.1.2 前庭畸形 包括前庭扩大、缺失、前庭发育不全。前庭扩大是最常见的。正常的前庭最大横径不超过 3.2 mm,超过 3.2 mm 且临床上出现先天感音聋即为前庭扩大畸形^[6]。本组中前庭畸形有 51 例(95 耳),其中 83 耳伴有其他畸形,约占 35.7%。

3.1.3 半规管畸形 包括半规管缺失、短小、狭窄、不连续、扩大。本组中半规管畸形有 73 例(127 耳),其中 69 耳伴有其他畸形,约占 29.7%。

3.1.4 内耳道畸形 包括内听道缺失、内听道狭窄、内听道扩大。正常内听道宽度 4~6 mm,小于 2 mm 为内听道狭窄,大于 8 mm 为内听道扩大,若在 6~8 mm 宽度,如临床上无症状,亦不能诊断为扩大,可属正常变异^[7]。本组中内耳道畸形 10 例(18 耳),约占 7.8%。内耳道狭窄时多伴有位听神经及发育不良^[8],本组中有 4 例(8 耳)内耳道狭窄,

表 3 125 例(232 耳)内耳畸形的听力损失分布

耳(%)

类型	>90 dBnHL	71~90 dBnHL	<71 dBnHL	合计
Michel 畸形	2(0.9)	0(0)	0(0)	2(0.9)
耳蜗发育不良	24(10.3)	0(0)	2(0.9)	26(11.2)
IP-I	10(4.3)	2(0.9)	3(1.3)	15(6.5)
Mondini 畸形	26(11.2)	2(0.9)	4(1.7)	32(13.8)
前庭-半规管畸形(不伴其它畸形)	66(28.4)	5(2.1)	15(6.5)	86(37.0)
内听道畸形(不伴耳蜗及前庭水管畸形)	10(4.3)	0(0)	1(0.4)	11(4.7)
前庭水管畸形(不伴耳蜗畸形)	33(14.3)	15(6.4)	12(5.2)	60(25.9)
合计	171(73.7)	24(10.3)	37(16.0)	232(100.0)

其中 3 例(6 耳)同时存在位听神经缺如、细小。听神经缺如是人工耳蜗植入的绝对禁忌证,术前影像学的评估十分重要,尤其是当内耳 CT 提示内耳道狭窄时,内耳 MRI 的检查听神经的情况是有必要的。

3.1.5 前庭水管、蜗水管畸形 包括前庭水管、蜗水管扩大。前庭水管扩大的影像学诊断标准为:前庭水管外口总长度的中点至半规管总脚的内径需大于或等于 1.5 mm^[9]。正常情况下前庭水管位于岩骨后缘,仅为一浅而微小的骨性切迹,其扩大时 CT 可显示。但扩大的内淋巴管及内淋巴囊 CT 不能显示,而 MR 内耳水成像可显示。本组中前庭水管畸形 40 例(80 耳),约占 34.5%,均为前庭水管扩大。在本组资料中及所见的文献报道中,均未发现蜗水管畸形。

前庭水管扩大可单独存在无伴内耳其它畸形,这类畸形伴有感音神经性听力损失、眩晕等症状者称为大前庭水管综合征,是 Valvassori 等于 1978 年首先报道的,在本组中有 52 耳,占前庭水管扩大患耳 65%。前庭水管扩大亦可伴有其他内耳畸形^[10],已有文献报道^[11]前庭水管扩大伴有其他内耳畸形的发病率为 41%~88%。在本组资料中,我们发现前庭水管扩大患耳伴有其他内耳畸形有 35%,接近于报道较低的一端,其中以伴有 Mondini 畸形居多。

Sennaroglu 等提出的以上内耳畸形分类方法目前已被越来越多的作者所接受和引用,并逐渐得到临床上的广泛应用。本组资料中,内耳畸形多表现为双侧,听力损失多为极重度,因此,对于双侧极重度聋的患者行影像学检查是否有内耳畸形是必要的。内耳畸形以耳蜗前庭畸形(32.3%)、前庭水管扩大(34.5%)较为常见。前庭及半规管畸形常伴有内耳其它部位的畸形,如耳蜗发育不全、Mondini 畸形等。表 3 说明不同内耳畸形的听力损失不同,各类畸形的听力均以极重度聋居多。声音的传导是声波传入内耳淋巴液后转变成液波振动,使得基膜振动,引起位于基膜上 Corti 器毛细胞的静纤毛运动,从而产生于螺旋神经节的神经冲动传入大脑听觉中枢产生听觉,在传导过程中任一部位的异常均有可能导致听力异常。耳蜗的畸形因其存在基膜上 Corti 器毛细胞的异常或减少导致神经冲动传入减少而引起听力损失,但单纯前庭、半规管畸形无毛细胞的异常,因此前庭、半规管畸形出现极重度感音神经性聋应注意是否同时存在胚胎期间受病毒感染或耳毒性药物引起的毛细胞异常,或者存在听神经、大脑听觉中枢病变。

3.2 不同听力损失内耳畸形发生率

为了比较先天性 SNHL 患儿与正常儿童的颞骨异常情况,McClay 等^[12]对其影像学做了统计学

研究,发现先天性 SNHL 患儿的颞骨发育异常率显著高于正常儿童,且认为重度或以上 SNHL 患儿的内耳畸形发生率较轻中度 SNHL 者高。本文对所搜集的 590 例感音神经性聋患儿的听力损失分级(表 2),并比较不同程度听力损失的内耳畸形发生率,重度聋以上患耳的内耳畸形率(21.71%)大于中度聋以下患耳的内耳畸形率(12.85%),与已有报道相符。在本组资料中,我们发现听力正常耳亦可存在内耳畸形(13.59%),多表现为前庭、半规管及前庭水管畸形。各有 1 例耳蜗发育不全及 Mondini 畸形表现为一侧耳听力正常,另一侧耳中度聋,考虑可能为耳蜗虽然畸形,但 Corti 器毛细胞异常量少及螺旋神经节细胞数量足够使得所产生的神经冲动足以出现听力。

目前,人工耳蜗植入是因先天性内耳畸形引起的耳聋患者恢复听力的有效治疗方法,已被广泛地应用,但必须指出各种不同的内耳畸形有其不同的特点,可影响人工耳蜗植入术能否实施及术后听力康复情况,并且对选择电极型号、适当的手术径路及预测并发症有重要意义^[13-14],因此术前进行影像学检查了解畸形的类型是必要的。

参考文献

- [1] SENNAROGLU L, SAATCI L. A new classification for cochleovestibular malformations [J]. *Laryngoscope*, 2002, 112: 2230-2241.
- [2] 杨伟炎.耳鼻咽喉头颈外科学新进展[M].北京:中华医学电子音像出版社,2006:11-11.
- [3] SENNAMGLU L. Unpartitioned versus incompletely partitioned cochleae: radiologic differentiation [J]. *Neurotol*, 2004, 25: 520-529.
- [4] 韩德民,李永新,赵啸天,等.不同内耳畸形人工耳蜗植入效果分析[J].*中华耳鼻咽喉科杂志*, 2004, 39(10): 589-593.
- [5] 韩东一,武文明,郝昕,等.先天性内耳畸形的人工耳蜗植入[J].*中华耳鼻咽喉科杂志*, 2004, 39(2): 85-88.
- [6] PURCELL D, JOHNSON J, FISCHBEIN N, et al. Establishment of normative cochlear and vestibular measurement to aid in the diagnosis of inner ear malformations[J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, 128: 78-87.
- [7] MCCLAY J E, TANDY R, GRUNDFAST K, et al. Major and minor temporal bone abnormalities in children with and without congenital sensorineural hearing loss[J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002, 128: 664-671.
- [8] 杨军,樊碧云,李幼瑾,等.关于内听道、耳蜗神经管及耳蜗神经畸形分型的建议[J].*临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(16): 1185-1187.
- [9] 黄选兆,汪吉宝.实用耳鼻咽喉科学[M].北京:人民卫生出版社, 2013: 1002-1004.

· 临床研究 ·

广西地区127例非综合征性聋患者常见致聋基因突变位点的筛查分析

刘水霞¹ 胥亮¹ 陈柏文¹ 刘闯¹ 瞿中红² 梁建平²
唐凤珠² 史敏² 彭璐² 景艳² 李凤提² 梁有琼²

[摘要] 目的:分析广西地区127例非综合征性聋患者常见致聋基因的突变特点。方法:采用遗传性聋基因芯片试剂盒对广西地区127例非综合征性聋患者基因组DNA的4个常见致聋基因的15个突变位点进行检测,对未确诊的阳性结果进行基因全序列分析进一步明确病因。结果:127例非综合征性聋患者致聋基因突变率为8.66%(11/127);其中GJB2 235delC纯合突变3例(2.36%),单杂合突变2例(1.57%);GJB2 235delC/109A>G复合杂合突变2例(1.57%);SLC26A4 1229C>T纯合突变1例(0.79%),IVS7-2A>G/IVS11+47T>C/1548insC复合杂合突变2例(1.57%);GJB3 538C>T单杂合突变1例(0.79%),未检出线粒体12S rRNA基因突变。结论:GJB2和SLC26A4是本组非综合征性聋患者最常见的突变基因,突变率明显低于全国平均水平,其中SLC26A4 IVS11+47T>C、1548insC和GJB2 109 A>G是3个新发现的突变位点,广西地区可能存在罕见的致聋基因突变位点。

[关键词] 非综合征性聋;基因突变;基因芯片

doi:10.13201/j.issn.1001-1781.2015.22.006

[中图分类号] R764.43 **[文献标志码]** A

Analysis common gene mutation spots of 127 non-syndromic deafness patients in Guangxi province

LIU Shuixia¹ XU Liang¹ CHEN Bowen¹ LIU Min¹ QU Shenghong²
LIANG Jianping² TANG Fengzhu² SHI Min² PENG Lu²
JING Yan² LI Fengti² LIANG Youqiong²

(¹Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, 530001, China; ²Department of Otolaryngology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region)

Corresponding author: TANG Fengzhu, E-mail:1960491231@qq.com

Abstract Objective: To investigate the mutation characteristics of common deafness gene from 127 non-syndromic hearing loss patients in Guangxi province. **Method:** Deafness-related gene mutations detection kit was used to detect 15 mutation sites in four deafness-associated genes, and a total of 127 hearing impaired patients were tested. The samples that could not be diagnosed with DNA microarray were subjected to PCR and sequenced to detect other mutations. **Result:** Among the 127 patients with non-syndromic deafness, the total mutation rate is 8.66% (11/127), including GJB2 235delC homozygous in 3 cases (2.36%), 235delC single heterozygous mutation in

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81460097);广西医疗卫生适宜技术研究开发与开发课题(No:S201421_05);广西壮族自治区卫生厅自筹经费科研课题(No:Z2014215, No:Z2015351)

¹ 广西中医药大学(南宁, 530001)

² 广西壮族自治区人民医院耳鼻咽喉科

通信作者:唐凤珠, E-mail:1960491231@qq.com

- [10] YIIN R S, TANG P H, TAN T Y. Review of congenital inner ear abnormalities on CT temporal bone[J]. Br J Radiol, 2011, 84: 859-863.
- [11] ALBERT S, BLONS H, JONARD L, et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations [J]. Eur J Hum Genet, 2006, 14: 773-779.
- [12] MCCLAY J E, BOOTH T N, PARRY D A, et al. Evaluation of pediatric sensorineural hearing loss with

magnetic resonance imaging [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2008, 134: 945-952.

- [13] 李建红, 王振常, 鲜军舫, 等. MRI在先天性内耳畸形儿童人工耳蜗植入术前的评估价值[J]. 磁共振成像, 2012, 3(6): 415-419.

- [14] 王斌, 魏朝刚, 曹克利. 内耳共同腔畸形电刺激听觉脑干诱发电位辅助人工耳蜗植入术及其疗效评估[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2011, 25(10): 436-440.

(收稿日期: 2015-09-16)