

Proliferatif ve Non-proliferatif Diyabetik Retinopatisi Olan Olgularda Sistemik Endotelial Fonksiyon

Systemic Endothelial Function in Patients with Nonproliferative Diabetic Retinopathy and Proliferative Diabetic Retinopathy

Mustafa ATAŞ¹, Hasan Basri ARİFOĞLU¹, Bahadır ŞARLI², Süleyman DEMİRCAN¹,
Ayşe ÖZKÖSE³, Emine PANGAL¹, İsa YUVACI¹, Altan GÖKTAS⁴

ÖZ

Amaç: Proliferatif (PDR) ve non-proliferatif diyabetik retinopatisi (NPDR) olan olguların akıma bağlı vazodilatasyonun (FMD) ölçülmesi yoluyla endotel fonksiyon cevaplarının değerlendirilmesi.

Gereç ve Yöntem: Sağlıklı 24 olgu (Grup 1), Diabetes mellituslu retinopatisi olmayan 20 olgu (Grup 2), NPDR li 25 olgu (Grup 3) ve PDR'li 13 olgu (Grup 4) çalışma kapsamına alındı. Bir kardiyolog tarafından brakiyal arterde oklüzyon oluşturulup endotel bağımlı akıma bağlı vazodilatasyonun (FMD) ölçülmesi yoluyla endotel fonksiyon cevapları değerlendirildi.

Bulgular: Çalışma kapsamındaki 82 hastanın 48'i (%59) kadın, 34'ü (%41) erkekti. Hastaların yaş ortalaması 57.15±10.29 idi. FMD artış yüzdesi ortalaması Grup 1'de 15.35±5.12, Grup 2 de 13.71±6.89, Grup 3 de 10.24±6.26 ve Grup 4 te 7.54±4.60 olarak tespit edildi. Grup 3 ve Grup 4'te Grup 1 ve Grup 2'ye göre FMD artış yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü (p = 0.001). PDR li ve NPDR li olgular arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (p=0.560). Gruplar arasında kan glukoz değeri dışında diğer biyokimyasal değerler açısından istatistiksel fark yoktu.

Sonuç: Tip 2 DM da proliferatif ve non-proliferatif olgularda kontrol ve retinopatisi olmayan olgulara göre sistemik endotel fonksiyonu cevabında azalma gösterdiği izlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, sistemik endotelial fonksiyon, akıma bağlı vazodilatasyon (FMD).

ABSTRACT

Purpose: To assess endothelial function in patients with proliferative diabetic retinopathy (PDR) and non proliferative diabetic retinopathy (NPDR) by using flow mediated dilatation (FMD).

Material and Methods: 24 healthy controls (Group 1), 20 patients have diabetes without retinopathy (Group 2), 25 patients with NPDR (Group 3) and 13 patients with PDR (Group 4) are enrolled in the study. In all cases, responses of endothelial function were assessed by a cardiologist through measurement of FMD following brachial artery occlusion.

Results: Fourtyeighteen (%59) of 82 patients enrolled in the study were female and 34 (%41) patients were male. Average age of patients was 57.15±10.29. Percentage of FMD increase were as follows :15.35±5.12 in Group 1, 13.71±6.89 in Group 2, 10.24±6.26 in Group 3 and 7.54±4.60 in Group 4. The percentages of FMD increase in Group 3 and Group 4 was statistically significant lower than FMD increase percentages in Group 1 and Group 2 (p=0.001). The difference between patients with PDR and patients with NPDR was not statistically significant (p=0.560). There was no statistically significant difference in biochemical assesments except blood glucose level between groups.

Conclusion: Decrease in systemic endothelial function was observed in diabetic patients (type 2 diabetes mellitus) with proliferative and non-proliferative diabetic retinopathy compared with controls and diabetic patients without retinopathy.

Key Words: Diabetes mellitus, Systemic endothelial function, flow mediated dilatation (FMD).

- 1- M.D. Kayseri Training and Research Hospital, Eye Clinic, Kayseri/
TURKEY
ATAS M., atasmustafa12@hotmail.com
ARİFOĞLU H.B., habasa@yahoo.com
DEMİRCAN S., dr.s.demircan@hotmail.com
PANGAL E., epangal@hotmail.com
YUVACI I., mdisay@hotmail.com
2. M.D. Kayseri Training and Research Hospital, Cardiology Clinic,
Kayseri/TURKEY
SARLI B., drsarli@yahoo.com
3. M.D. Asistant, Kayseri Training and Research Hospital, Eye Clinic,
Kayseri/TURKEY
ÖZKOSE A., ayse.ozkose@hotmail.com
4. M.D. Associate Professor, Kayseri Training and Research Hospital,
Eye Clinic, Kayseri/TURKEY
GÖKTAS A., altandr@hotmail.com

Geliş Tarihi - Received: 02.01.2014
Kabul Tarihi - Accepted: 23.06.2014
Ret-Vit 2014;22:293-296

Yazışma Adresi / Correspondence Adress: M.D. Mustafa ATAS
Kayseri Training and Research Hospital, Eye Clinic, Kayseri/TURKEY

Phone: +90 533 650 32 49
E-mail: atasmustafa12@hotmail.com

GİRİŞ

Diabetik retinopati (DR) diyabetin sık görülen ve görmeyi tehdit eden mikrovasküler komplikasyonlarından biridir. Dünya genelinde 20 ila 74 yaş arasındaki kişilerde önlenebilir görme kaybının en sık nedenidir.¹ Endotelial disfonksiyonun DR patogenezinde ve progresyonunda anahtar rol oynayabileceği bildirilmiştir.² Vasküler endotelial fonksiyonu ölçümünde girişimsel ve girişimsel olmayan birçok yöntem kullanılmaktadır. Brakiyal arterde oklüzyon ile endotel bağımlı akıma bağlı dilatasyon (FMD) yöntemi endotel fonksiyonu ölçümünde daha önce koroner arter risk faktörlerinde (HT, hiperkolesterolemisi, homosisteinemi v.b) sıklıkla kullanılan non-invaziv bir yöntemdir. FMD nin endotelial hücrelerce üretilen NO ile oluştuğu düşünülmektedir.³

Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda sağlıklı, PDR'li ve NPDR'li olgular arasında FMD yüzdesinde çelişkili sonuçlar bildirilmiştir.⁴⁻⁶ Bu durum brakiyal FMD ile ölçülen sistemik endotelial disfonksiyonun Tip 2 DM'li hastalarda retinopati patogenezinde bir etkisinin olup olmadığını konusunda daha çok araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Vasküler endotelial fonksiyon ölçümü için FMD kullanılan bu çalışmanın amacı PDR'li ve NPDR'li olgular ile sağlıklı olgular arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Helsinki deklarasyonuna uygun olarak yürütüldü. Çalışma için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulundan izin alındı (Karar no: 2013/328). Ayrıca hastalardan sözlü ve yazılı onamları alındı. Çalışmaya sağlıklı 24 olgu (Grup 1), Retinopatisi olmayan diabetli 20 olgu (Grup 2), NPD'li 25 olgu (Grup 3) ile PDR'li 13 olgu (Grup 4) dahil edildi. Tüm hastalardan açlık kan şekeri, HbA1c, lipid profili, C-reaktif proteini (CRP) ve sedimentasyon hızı ölçümleri için kan örnekleri alındı. Sigara içen, düzenli alkol kullanan, koroner arter hastalığı veya serebrovasküler olay, akut enfeksiyon, kronik karaciğer hastalığı, kalp yetmezliği, malignensi, böbrek yetmezliği hikayesi olan, kontrolsüz hipertansiyonu (sistolik kan basıncı > 160 mmHg veya diyastolik kan basıncı > 100 mmHg) ve kontrolsüz diyabeti (HbA1c > %10) olan kişiler çalışma dışı bırakıldı. Diabetik hastaların oral antidiyabetik ve insülin kullananların ilaçlarına devam etmesi istendi. Antihipertansif veya endotel fonksiyonunu etkileyen başka ilaç kullanan hastalar çalışmaya alınmadı. DR nin tespiti için standart oftalmolojik muayene, retina görüntülemesi ve PDR tespiti için de fundus floresin anjiyografi uygulandı. FFA da neovaskülarizasyonun izlenmesi ile PDR tanısı konuldu.

Brakiyal arterin FMD ölçümleri hastaların klinik özelliklerini bilmeyen bir kardiyolog tarafından daha önce tariflenen şekilde iki boyutlu, yüksek çözünürlüklü (7.0-13.0 MHz) ultrason (Siemens Medical Sol. Mountain View, CA) ile sol koldan yapıldı⁷. Görüntüleme 22°-25° C sıcaklıkta sessiz ve loş bir odada yapıldı. Ölçüm öncesi hastalar supin pozisyonunda 10 dakika kadar istirahata alındılar ve son ölçüme kadar sürekli EKG monitorizasyonu yapıldı. Radyal arter ölçümü antekübital fossanın 3 ila 5 cm üzerinden yapıldı. Geçiş zonu 3 cm derinlikteki alan ile yakın duvarın derinliği olacak şekilde ayarlandı. Görüntü büyütülerek medya ve adventisya arasındaki ara yüzey (m çizgisi) belirginleştirildi. Pulse doppler incelemede kan akım hızı ve hacmi damar lümenine 65°-70° açı ve 1 mm genişliğinde örneklem aralığı ile arterin merkezinden elde edilen sinyaller ile oluşturulan bazal iki boyutlu görüntüler ile değerlendirildi. Brakiyal arter seviyesinde tansiyon aletinin manşonu 250 mmHg seviyesine şişirilerek 5 dakikalık oklüzyon sağlandı. Manşon aniden söndürüldü ve pulsed doppler akım sinyalleri 5 ila 10. saniyede kaydedildi. Reaktif hiperemi renkli akım görüntülemesinde mozaik değişiklikler ve akım hacminde artış ile gözlemlendi. Manşon söndürüldükten 60 saniye sonra brakiyal arterin iki boyutlu görüntüleri kaydedildi. Radyal arter ölçümleri EKG deki R dalgası esnasında (end-diastol) kayda alındı. Brakiyal arter çapının hiperemiye cevabı yüzde artış değeri $100 \times [\text{oklüzyon sonrası çap (mm)} - \text{ilk çap (mm)}] / \text{ilk çap (mm)}$ olarak hesaplandı.

İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram ve q-q grafikleri ile ayrıca Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için normal dağılıma uygun değişkenler için tek yönlü varyans analizi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey ve Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testleri kullanıldı. Gruplar arası nitel değişkenler için yapılan karşılaştırmalarda Pearson kare analizi kullanıldı. Fmd yüzde değişimi ile diğer nicel değişkenler arasındaki korelasyon analizi için Spearman testi kullanıldı. Verilerin analizi R 3.0.3 (www.r-project.org) yazılımı ile gerçekleştirildi. p<0.05 anlamlılık düzeyi kabul edildi.

BULGULAR

Çalışma kapsamındaki 82 hastanın 48'i (%59) kadın, 34'ü (%41) erkekti. Olguların demografik özellikleri, FMD değişim yüzdesi ve laboratuvar değerleri tablo'da verilmiştir. Hastaların yaş ortalaması grup 1'de 54.46 ± 10.04 (40-71 arasında), grup 2'de 55.63 ± 8.4 (39-71 arasında), Grup 3'de 59.6 ± 10.2 (38-78 ara-

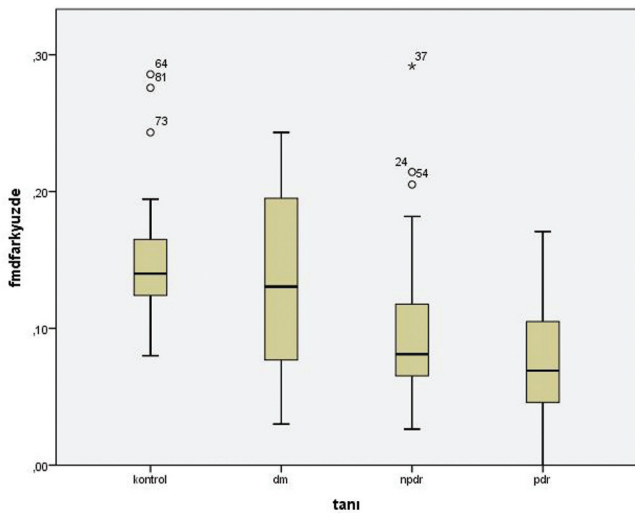
Tablo: Olguların demografik verileri ve laboratuvar sonuçları.

	KONTROL (n=24)	DM (n=20)	NPDR (n=25)	PDR (n=13)	P
Yaş (yıl) (Ort±SS)	54.46±10.04a	53.56±9.29a	59.60±10.2a	62.83±9.73b	.027*
FMD %	14 (12-17)a	13 (8-20)a	8 (7-12)b	7 (5-11)b	.001*
Ortanca (25p-75p)					
Glukoz	89 (81-97)a	129 (95-172)a	296 (164-375)b	259 (151-450)b	.001*
Ortanca (25p-75p)					
HbA1c (%)	-	6.85 (6.20-8.50)	8.60 (7.70-10.70)	8.30 (8.10-8.50)	.222
Ortanca (25p-75p)					
Ast	22 (18-27)	21 (19-25)	20 (16-27)	17 (14-27)	.800
Ortanca (25p-75p)					
Alt	18(13-23)	24 (11-26)	20 (17-33)	17.50 (9-26)	.587
Ortanca (25p-75p)					
Trigliserit (mg/dl)	163 (146-190)	165 (115-220)	187 (150-306)	229 (172-329)	.187
Ortanca (25p-75p)					
HDL kolesterol (mg/dl)	43 (41-47)	42.50 (37-56)	52 (42-60)	41 (40-50)	.236
Ortanca (25p-75p)					
LDL kolesterol (mg/dl)	113 (90-125)	129 (88-176)	119 (111-138)	135 (110-158)	.646
Ortanca (25p-75p)					
Bun Ortanca (25p-75p)	15 (14-20)	13 (10-15)	15 (13-20)	19 (12-27)	.175
C reaktif protein	3.3 (3.19-5.67)	5.06 (3.3-5.9)	6.64 (5.64-7.64)	3.3 (3.1-4.6)	.385
Ortanca (25p-75p)					
Sedimentasyon hızı (mm/s)	11 (4-12)	14 (8-20)	11 (3-30)	19 (3-34.5)	.700
Ortanca (25p-75p)					
Kreatinin	0.8 (0.7-1)	0.6 (0.5-0.7)	0.7 (0.6-0.8)	0.9 (0.6-1.5)	.074
Ortanca (25p-75p)					

Ort±SS: Ortalama±Standart Sapma, 25p-75p: 25. ve 75. yüzdeler.

Değerler ±standart sapma olarak verilmiştir. Üst simge olarak gösterilen farklı harfler arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı değerler "*" olarak gösterilmiştir (*p< 0.05).

sında) ve grup 4'te 62.23±9.56 idi (45-81 arasında), (p=0.027). FMD artış yüzdesi ortanca değeri ve 25. yüzdeler. 75. yüzdeler grup 1'de 14 (12-17), grup 2'de

**Grafik:** Gruplarda FMD artış oranları.

13(8-20), grup 3'de 8 (7-12) ve grup 4'de 7(5-11) olarak tespit edildi. Grup 3 ve grup 4'de grup 1 ve grup 2'ye göre FMD artış yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü (p=0.001). PDR'li ve NPDR'li olgular arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi (p=0.317). Gruplar arasında, cinsiyet, total kolesterol, LDL kolesterol, HDL kolesterol, trigliserit, kreatinin, sedimentasyon hızı, CRP açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. HbA1c yönünden, Grup 2, 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Kontrol grubunda HbA1c değerleri bakılmadı (p=0.222). Kan glukoz değerleri grup 1 ve grup 2'de grup 3 ve grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü (p=0.001). FMD artış yüzdesi diabetik maküla ödemi olanlarda olmayanlara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü (p=0.001). Spearman korelasyonunda FMD artış yüzdesi ile kan glukoz düzeyi ve diabetik retinopatinin evresi arasında istatistiksel olarak negatif anlamlı bir korelasyon vardı (rho=-0.353, p=00.7), (rho=-0.496, p=00.1), sırasıyla.

TARTIŞMA

Bu çalışmada Tip 2 DM'li hastaların FMD yüzdesi yaş ve cinsiyet uyumlu sağlıklı olgulara göre düşük olarak bulunmuşken NPDR ve PDR'li grup arasında bir fark izlenmemiştir. FMD klinik araştırmalar için arter endotelial fonksiyon ölçümünde kullanılan altın standart tanı yöntemidir.^{3,8} Endotelium kan akımı kontrolünde önemli bir role sahiptir. Birçok vazoaaktif ajan ve hormon cevabına ek olarak kendisi de nitrik oksit (NO) gibi damar düz kasını gevşeten ve endotelin-1 (ET-1) gibi damar düz kasını kastıran maddeler salgılamaktadır. NO ve ET-1 arasında denge-sizlik iskemi veya vasküler disrregülasyona neden olur.⁸ Tip 2 DM'li hastalarda endotel bağımlı vazodilatasyonda azalma olduğu bildirilmiştir ve bu durum bizim sonuçlarımızla uyumludur.^{2,9}

Suetsugu ve ark.,⁴ Tip 2 DM'li hastalarda FMD yüzdesinde azalma olduğunu bildirmiştir yine aynı çalışmada PDR'li hastalarda retinopati gelişmemiş olgulara göre FMD'nin daha düşük izlendiği bildirilmiştir. Yun ve ark.,¹⁰ ise diyabetik retinopatisi olan ve olmayan olguları karşılaştırdığı çalışmada retinopatisi olan grupta FMD nin düşük bulunduğunu bildirmiştir. Sogawa ve ark.,⁵ ise diyabetik retinopatiyi AAO sınıflamasına göre 5 gruba ayırdıkları çalışmalarında Tip 2 DM li olgularda gruplar arasında FMD yüzdesi arasında bir fark izlenmemişler ancak diyabetik ve sağlıklı olguları karşılaştırdıklarında Tip 2 DM'li olgularda FMD yüzdesini daha düşük bulmuşlardır. Yine aynı çalışmada diyabetin süresi ile FMD arasında negatif korelasyon bulunmuştur ve endotelial disfonksiyonun PDR gelişiminden daha önce geliştiği bildirilmiştir. Bu sonuçlar bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Birçok klinik çalışmada koroner ve brakiyal arter arasında endotel fonksiyonunun ilişkili olduğu gösterilmesinden sonra brakiyal arter FMD'nin diğer organlarda da vasküler endotelial fonksiyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.^{11,12} Pemp ve ark.,¹³ Tip 1 DM'li hastalarla sağlıklı olgulara göre FMD'yi azalmış olarak bulmuşken retinal damarlarda titreşim uyarımlı vazodilatasyon ve FMD arasında sadece zayıf bir korelasyon bulunmuştur. Bu durum brakiyal arter FMD'nin retinal endotelial fonksiyon ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Tip 2 DM li hastalarda retinopati gelişiminde etkisi olan mikroalbuminüri gelişiminin sistemik endotelial disfonksiyonu ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir.^{14,15} Bu sonuçlara göre sistemik endotelial disfonksiyonu ile Tip 2 DM'li hastaların retinal arteryollerindeki mikrovasküler anormallikler arasında bir korelasyon olduğunu öne sürülebilir.

Uzun ve ark.,¹⁶ 14 diabetik hasta, 20 sigara içen, ate-reosklerozlu ve kronik hipertansiyonu olan 16 ve sağlıklı kontrol 15 olmak üzere toplam 65 kişide endotel fonksiyonunu araştırdıkları çalışmalarında, diabetiklerde kontrol grubuna göre endotel fonksiyonunu daha düşük bulmuşlardır. Diğer gruplar arasında ise fark bulamadıklarını bildirmektedirler. Fakat bu çalışmada diabetik retinopati evresi değerlendirilmemiştir.

Hasta sayısının az olması, antihipertansif olarak kullanılan bazı ilaçların (ACE inhibitörleri gibi) FMD ölçümelerini etkilemesi ve FMD'nin uygulayıcı bağımlı

bir test olması bizim çalışmamızı kısıtlamaktadır. FMD ölçümlerinin uygulayıcılar arasında veya aynı uygulayıcı içinde değişiklik gösterebileceği düşünülebilir.¹⁷ Ancak önceden yapılmış çalışmalarda bu değişikliklerin minimal olduğu ve sonucu etkilemediği bildirilmiştir.³ Bizim çalışmamızda ölçümler tecrübeli bir kardiyolog tarafından yapılmıştır.

Mevcut bulgulara göre Tip 2 DM'li olgularda diyabetik retinopatinin sistemik endotel disfonksiyonu ile birliktelik gösterdiğini ve endotelial fonksiyonun retinopatinin erken dönemlerinde bozulduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA* 2007;298:902-16.
2. Malecki MT, Osmenda G, Walus-Miarka M et al. Retinopathy in type 2 diabetes mellitus is associated with increased intima-media thickness and endothelial dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:925-30.
3. Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, et al. Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 1995;74:247-53.
4. Suetsugu M, Takebayashi K, Aso Y. Association between diabetic microangiopathy and vascular endothelial function evaluated by flow-mediated vasodilatation in patients with type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* 2007;61:920-6.
5. Sogawa K, Nagaoka T, Tanano I et al. Association between diabetic retinopathy and flow-mediated vasodilatation in type 2 DM. *Current Eye Research* 2012;37:446-51.
6. van Hecke MV, Dekker JM, Nijpels G et al. Are retinal microvascular abnormalities associated with large artery endothelial dysfunction and intima-media thickness? The Hoorn Study. *Clin Sci* 2006;110:597-604.
7. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ et al. International brachial artery reactivity task force. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilatation of the brachial artery: a report of the international brachial artery reactivity task force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.
8. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007;115:1285-95.
9. Henry RM, Ferreira I, Kostense PJ et al. Type 2 diabetes is associated with impaired endothelium-dependent, flow-mediated dilation, but impaired glucose metabolism is not; The Hoorn Study. *Atherosclerosis*. 2004;174:49-56.
10. Yun JS, Ko SH, Kim JH, et al. Diabetic retinopathy and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab J*. 2013;37:262-9.
11. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD et al. Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1235-41.
12. Teragawa H, Ueda K, Matsuda K et al. Relationship between endothelial function in the coronary and brachial arteries. *Clin Cardiol* 2005;28:460-6.
13. Pemp B, Weigert G, Karl K et al. Correlation of flicker-induced and flow-mediated vasodilatation in patients with endothelial dysfunction and healthy volunteers. *Diabetes Care* 2009;32:1536-41.
14. Wirta O, Pasternack A, Mustonen J, et al. Retinopathy is independently related to microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Clin Nephrol* 1999;51:329-34.
15. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, et al. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* 2002;51:1157-65.
16. Uzun A, Yener AÜ, Gedik HS ve ark. Endotel disfonksiyonu araştırmasında noninvaziv indikatör olarak kullanılan periferik arteriyel endotel fonksiyon testi ve sonuçları. *Damar Cer Derg* 2012;21:244-9.
17. Ghiadoni L, Magagna A, Versari D et al. Different effect of antihypertensive drugs on conduit artery endothelial function. *Hypertension* 2003;41:1281-16.