

局灶性皮层发育不良的研究进展

张馨月, 张巍*

新疆医科大学第一附属医院病理科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2023年2月15日; 录用日期: 2023年3月14日; 发布日期: 2023年3月21日

摘要

局灶性皮层发育不良(focal cortical dysplasia, FCD)是耐药性癫痫最常见的病因, 其根本病理改变是大脑皮层发育畸形, 临床表现为幼儿时期发作的局灶性癫痫。FCD的早期诊断及治疗, 能有效减轻患者神经发育障碍的症状。通过总结近年来在FCD认识方面的进展, 并对其分型、发病机制、诊断及治疗方面的研究进展加以综述, 以期为今后的实验研究及临床诊疗提供参考。

关键词

局灶性皮层发育不良, 分类, 发病机制, 诊断, 治疗

Research Progress of Focal Cortical Dysplasia

Xinyue Zhang, Wei Zhang*

Department of Pathology, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

Received: Feb. 15th, 2023; accepted: Mar. 14th, 2023; published: Mar. 21st, 2023

Abstract

Focal cortical dysplasia is the most common cause of drug-resistant epilepsy. Its fundamental pathological change is cerebral cortical malformation, which is clinically manifested as focal epilepsy in childhood. Early diagnosis and treatment of FCD can effectively alleviate the symptoms of neurodevelopmental disorders to summarize the progress in understanding FCD in recent years, and review the research progress in classification, pathogenesis, diagnosis and treatment of FCD, with a view to providing reference for future experimental research and clinical diagnosis and treatment.

Keywords

Focal Cortical Dysplasia, Classification, Pathogenesis, Diagnosis, Treatment

*通讯作者。



1. 引言

局灶性皮层发育不良是皮质发育畸形(Malformation of cortical development, MCD)的亚型, 据统计, 难治性癫痫患者术后病理结果 46.5%为 FCD [1], FCD 是导致难治性癫痫的常见病因之一, 也是儿童癫痫手术切除最常见的致病病灶[2]。本文主要对其分型、发病机制、诊断及治疗方面的研究进展加以综述, 以期为今后的实验研究及临床诊疗提供参考。

2. FCD 的分类

1971 年 David Taylor 等人初次定义 FCD, 病理诊断标准是皮质分子层结构紊乱和异常神经元, 最具特征性的异常神经元是增大且形态怪异的异形神经元和气球样细胞。根据不同的评判标准, FCD 的分类也不尽相同, 最初被人们广泛认可的是 Palmini 分类。Palmini 分类依据有无异形神经元将 FCD 分为 I 型和 II 型, I 型根据有无巨型或不成熟的神经元分为 Ia 型及 Ib 型, II 型根据有无气球样细胞分为 IIa 型及 IIb 型[3]。之后随着人们对 FCD 发病机制、基因组学及影像学等的深入探究, FCD 的分类标准也发生了变化。2011 年国际抗癫痫联盟(ILAE)以 Palmini 分类为基础, 对 FCD 分型标准做了新的补充, 增加了 FCD Ic 型, 并引入 FCD III 型, 将与海马硬化、神经节或神经胶质肿瘤、血管畸形以及伴随生后早期任何后天获得性的损害相邻的皮质层状结构畸形分别定义为 FCD IIIa 型、FCD IIIb 型、FCD IIIc 型及 FCD IIId 型。新的分型需要与双重病理相鉴别, 例如要明确 FCD IIIb 型皮层病变是否是神经胶质肿瘤的继发病变, 若与肿瘤无关, 应称为双重病理。2011 年 ILAE 关于 FCD 的国际共识分类在出现后已被广泛用于实验研究和临床工作, 但其临床病理分类仍然具有挑战性, 由于 FCD I 型和 FCD III 型缺乏神经生理学、影像学、组织病理学和遗传生物标志物, 其亚型分类在最近的研究中备受争议[4]。Kobow 等人发现基因组 DNA 甲基化分析可以作为一种新型诊断方法, 将临床病理与分子病理结合, 区分 FCD Ia、IIa 和 IIb 型[5]。随着对 FCD 分子病理、遗传机制的探索, 其分型标准也会更加科学, 具有可操作性, 为疾病后续治疗提供依据。

3. FCD 的发病机制

FCD 主要于胚胎宫内大脑皮层形成时期发生。围产期或产后损伤、病毒感染以及遗传因素都可能影响胚胎宫内皮层的形成, 导致 FCD 发生[6]。

随着不断深入探索 FCD 的发病机制, 目前提出两种猜想: 1) 有学者认为 FCD 是一种没有额外表现的结节性硬化症(Tuberous sclerosis complex, TSC), FCD IIb 型的气球样细胞与 TSC 患者皮质结节中的球囊细胞类似。TSC1 是结节性硬化症中常见的致病基因, FCD IIb 型中 TSC1 基因处 TSC1 多态性积累, 并出现杂合性或微卫星不稳定性缺失; 2) HPV 感染可能在 FCD IIb 型的发病机制中发挥相关作用。研究发现人乳头瘤病毒 16 (HPV-16) E6 蛋白在 FCD IIb 型标本的气球样细胞区域均有表达, 将 E6 蛋白引入胎鼠大脑会导致大脑发育畸形, 增强 mTORC1 信号传导[7]。但这两种看法目前都还不成熟, 还有待理论与实验的进一步佐证。

而对于哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Mechanistic Target Of Rapamycin, mTOR)通路靶标基因突变导致 FCD II 型已经达成共识。mTOR 通路与细胞增殖、自噬、转录和蛋白质合成密切相关。在神经系统发育

过程中 mTOR 过度激活可导致神经元细胞异常增大, 形成 FCD IIb 型特征性的异形神经元[8]。近年来, 研究发现 FCD II 型中存在 mTOR 通路内多种基因突变, 包括 AKT1、MTOR、PIK3CA 及 TSC1/2 等[9] [10]。其中 TSC1、TSC2 与 TBC1D7 形成的 TSC 复合体中包含一个 GTP 酶活化蛋白结构域, 可以将 GTP 形式的 Rheb 水解为 GDP 形式的 Rheb, 导致 Rheb 失活, 不能激活 mTORC1, 抑制 mTOR 通路信号传导。FCD II 型患者中发现的 TSC1/2 突变, 会使 TSC 复合体丧失功能, 致使 mTOR 通路过度激活, 从而影响皮层神经元的成熟和迁移, 导致 FCD。对于 mTOR 通路, FCD 主要与 PIK3CA 或 AKT3 等基因激活突变产生的 1 型嵌合体相关(新杂合突变) [11]。嵌合体的替代等位基因分数(alternative allele frequencies, AAF)会影响临床表型, FCD II 型主要与低水平镶嵌突变有关[12]。

近年来, 尽管关于 FCD 的相关研究在分子、遗传及电生理方面都取得了一定进展, 但其发病的确切机制仍需未来继续探索研究。

4. FCD 的诊断

4.1. FCD 的临床表现

FCD 在儿童时期常出现局灶性癫痫。一项针对儿童新发癫痫的前瞻性研究显示, 21% 的患者 MRI 结果提示皮质畸形, 包括 FCD [13]。FCD 在成人则表现为热性惊厥, 其中 10%~30% 的病例可出现癫痫持续状态[14]。

FCD 患者的癫痫症状通常于患者儿童时期即发作, 约 60% 的患者在 4 岁前发作, 约 90% 的患者在 12 岁前发作[15]。其发病年龄可能与 FCD 病灶大小、位置[16]及组织病理学亚型相关[17], Natrujee 等人研究发现患者 FCD 病灶体积大者倾向于早期发作, 而位于默认模式网络(default mode network, DMN)中的 FCD 和发病年龄 < 5 岁相关[16], Lamberink 及其团队发现, FCD I 型癫痫发作的平均年龄是 5 岁, FCD II 型癫痫发作的平均年龄是 3 岁[17]。此外, Lawson 研究发现组织病理学亚型可能影响患者的临床表现, 相对于 FCD IIb 型, FCD IIa 型的新生儿发病率、偏瘫和严重认知障碍的发生率更高[18]。

4.2. FCD 的辅助检查

1) 脑电图: FCD 不同亚型在脑电图中表现差异很大。FCD II 型在立体定向脑电图(stereoelectroencephalography, SEEG)中相对特异性的表现是: 缺乏背景活动, 重复的高振幅快速尖峰及高振幅慢波, 在癫痫发作期间, 先出现重复性快速尖峰爆发, 之后出现低电压快速活动[19]。研究发现脑电图中高频振荡(high frequency oscillation, HFO), 即 100 到 500 Hz 之间的颅内脑电图频率, 可以反映疾病的严重程度, 并预测术后结果。Kerber 等人发现 HFO 在 FCD 不同亚型中出现的频率不同, 相对于 FCD I 型, HFO 率在 FCD IIa 型和 IIb 型中显著提高, 这提示 HFO 可以作为 FCD 分型的佐证之一[20]。而 HFO 率与总体癫痫发作负担相关, 因此可以通过长期脑电图记录的 HFO 率, 并将其作为评估 FCD 致癫痫活动的标志物[21]。

2) 脑磁图(Magnetoencephalography, MEG): MEG 由于其高时间及空间分辨率, 可以检测出直径小于 3 mm 的局灶性癫痫活动。MEG 源成像(magnetic source imaging, MSI)可以在 FCD 可见病变的基础上, 定义其功能网络, 可用于绘制癫痫网络, 指导病灶扩切范围。

FCD 预后的决定因素是病灶是否被完全切除, MEG 及 MSI 对确定 FCD 病灶范围起指导作用, 而随着人们对 FCD 认识的不断深入, 发现手术中除了需要彻底切除病灶外, 还必须考虑如何保护病人的大脑功能, 改善他们的生存质量。MEG 联合神经导航无论对于 FCD 癫痫患者病灶的定侧、定位, 还是术中皮层功能保护及避免手术并发症, 都极有价值[22]。

3) 氟脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描 (fluorodeoxyglucose positron emission tomography, FDG-PET):

FDG-PET 检测 FCD 的灵敏度为 69%~98%，明显高于 MRI，特别是对 MRI 阴性的 FCD IIa 型及 IIb 型的诊断。研究发现 FCD 癫痫患者的 FDG-PET 中低代谢区有意义，其中最强低代谢区可能对应 FCD 和癫痫发作起始区，而较强低代谢区可能对应癫痫网络范围[23]。FDG-PET 检测由于假阳性率高，现多用于与 SEEG 共同评估癫痫发作区的范围。FDG-PET 检测具有无创性的优点，未来对它的应用将降低对侵入性监测的需求，可以有效减轻病人疼痛。

4) 发作期单光子发射计算机断层扫描(Single-Photon Emission Computed Tomography, SPECT): SPECT 可以检测 FCD 患者的癫痫发作起始区，灵敏度为 48%~64%。SPECT 中高灌注区在不同的研究中均出现了与 MRI 对 FCD 病变的共定位。但是由于 SPECT 高灌注区的范围反映癫痫发作的传播网络，故通常大于 MRI 或 SEEG 定义的病变范围，而过大范围的切除通常是不必要的，因此，应该结合多模式成像集成技术，在手术前进行更精准的定位，尽量减少过度切除 FCD 病灶。

5) 磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI): MRI 是一种无创检测方法，MRI 中 FCD 表现为皮质厚度局灶增加，灰、白质界限模糊、脑回或脑沟不平滑以及出现白质异常信号。相较于 FCD I 型，MRI 对 FCD II 型的检出率明显升高。

MRI 的诊断率受影像诊断医师专业知识和技术等多种因素影响，随着更高场强的引入，高灵敏度和高分辨率技术已经广泛应用于临床诊疗。3T 成像技术应用提高了 1.5T 成像中 MRI 阴性病例的结构异常检出率。而 7T 超高场成像在检测 FCD 的高诊断率也在多项研究中得到证实[24]。

Tahry 等人的一项前瞻性研究发现，7TMRI 应用基于体素的形态分析程序(MRI 后处理技术)后，脑结构性异常的检出率从 22%增加到 43%，其病变主要为 FCD [25]。证实 MRI 后处理技术可以显著提高 FCD 检出率，其技术的应用可以实现对 FCD 更为精确的检测。

5. FCD 的治疗

5.1. 手术治疗

针对 FCD 相关难治性癫痫，最有效的治疗手段是外科手术[26]。与 FCD 相关的癫痫的手术治疗需要团队合作，结合临床数据、脑 MRI 及 FDG-PET 等结果，对患者大脑 3D 解剖结构建模分析并制定手术计划。

多种因素均可能对手术预后造成影响，如病灶有无完全切除、病灶位置、FCD 病理类型等。对手术预后起到关键性作用的是病灶有无完全切除，完全切除是指将 MRI 所见的异常结构区域、电生理技术检测出的癫痫发作起始区以及术中脑电图检测异常区全部切除。病灶如果位于重要功能区，可能会导致切除不完全，对预后造成不良影响。由于 I 型 FCD 结构异常区更广泛，且 MRI 等检查检出率低，导致相较于 FCD II 型，FCD I 型预后不佳[17]。

外科手术术式由病变和癫痫发作区域的大小决定，可以分为局灶性、脑叶、多叶和半球切除手术。立体定向手术和激光间质热疗(laser interstitial thermotherapy, LITT)已在 MCD 相关癫痫中作为一种新的手术方法得到应用。在 Bourdillon 团队的研究中其术后癫痫发作控制率超过 80% [27]。与传统手术相比，LITT 虽然具有手术时间短、住院时间短、并发症发生率低等优点[28]，但其不足之处也是显而易见的，LITT 术后组织无法进行组织病理学诊断，限制了该技术的临床应用。

5.2. 抗癫痫药物(Anti-Epileptic Drug, AED)

AED 是一种预防癫痫发作的抗惊厥药物。AED 能够与大脑中的神经细胞互相作用，降低其活性，发挥抑制癫痫发作的作用。FCD 的特定抗癫痫药物至今尚未被发现。FCD 患者抗癫痫药物的选择取决于癫痫发作的类型以及癫痫发作的年龄，有文献报道只有约 17%的患者药物治疗有效[15]。虽然 AED 在 FCD

治疗中的作用有限, 但仍需继续进行相关临床研究, 以期其提供新的研究思路。

5.3. mTOR 抑制剂

TSC 和 FCD 都是由于 mTOR 通路基因中的一系列致病变异引起的疾病, 针对 mTOR 通路抑制剂的研究有望对相关疾病的治疗指明新的方向。mTOR 抑制剂包括能特异性作用于 mTORC1 的雷帕霉素及其类似物西罗莫司和依维莫司, 它们可以通过对 mTORC1 的抑制作用, 降低下游效应器的磷酸化水平, 从而抑制异常细胞生长、轴突形成, 并通过阻断突触活动减少 AMPA (α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸) 受体的表达, 并增加 GABA_A (γ -氨基丁酸 A 型) 受体介导的神经递质来提高皮质兴奋性。French 等人在 TSC 患者中将依维莫司作为 TSC 相关的耐药性癫痫发作的治疗方式, 进行了试验。其中治疗组的整体缓解率为 40.0%, 而安慰剂组的总体缓解率为 15.1%, 这对 TSC 患者在选择治疗方法上具有指导意义[29]。TSC 和 FCD II 型都有 mTOR 通路的共同遗传背景, 所以 mTOR 通路抑制剂的研究对 FCD 的治疗也具有指导意义, 需要更进一步探索 mTOR 通路在 FCD 中的发生机制及靶向用药的可能性分析, 为其临床应用提供理论依据。

6. 总结与展望

近年来, 在分子、遗传和电生理学方面, 学者们对 FCD 的研究都取得了一定的进展。但目前其发病的确切机理, 仍有待进一步的探索和研究, 且 FCD 的分类标准也亟待完善。影像学技术的不断革新, 明显提高了 FCD 的检出率及致痫灶定位的准确性。相较于传统的手术及 AED 药物治疗, mTOR 抑制剂等靶向药物的研究可能为未来 FCD 患者个体化精准治疗提供方向。

基金项目

新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2022D01D072)。

参考文献

- [1] Bingaman, W.E. (2004) Surgery for Focal Cortical Dysplasia. *Neurology*, **62**, S30-S34. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000114508.31261.E6>
- [2] Wong, M. (2008) Mechanisms of Epileptogenesis in Tuberous Sclerosis Complex and Related Malformations of Cortical Development with Abnormal Glioneuronal Proliferation. *Epilepsia*, **49**, 8-21. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01270.x>
- [3] Palmmini, A., Najm, I., Avanzini, G., et al. (2004) Terminology and Classification of the Cortical Dysplasias. *Neurology*, **62**, S2-S8. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000114507.30388.7E>
- [4] Ingmar Blümcke, Maria Thom, Eleonora Aronica, 等. 局灶性皮层发育不良的临床病理分类新标准——ILAE 诊断方法委员会协作组专家共识[J]. *癫痫杂志*, 2020, 6(6): 537-545.
- [5] Kobow, K., Ziemann, M., Kaiphanickal, H., et al. (2019) Genomic DNA Methylation Distinguishes Subtypes of Human Focal Cortical Dysplasia. *Epilepsia*, **60**, 1091-1103. <https://doi.org/10.1111/epi.14934>
- [6] Krsek, P., Jahodova, A., Maton, B., et al. (2010) Low-Grade Focal Cortical Dysplasia Is Associated with Prenatal and Perinatal Brain Injury. *Epilepsia*, **51**, 2440-2448. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02730.x>
- [7] Chen, J., Tsai, V., Parker, W.E., et al. (2013) Detection of Human Papillomavirus in Human Focal Cortical Dysplasia Type IIB. *Annals of Neurology*, **72**, 881-892. <https://doi.org/10.1002/ana.23795>
- [8] Baldassari, S., Ribierre, T., Marsan, E., et al. (2019) Dissecting the Genetic Basis of Focal Cortical Dysplasia: A Large Cohort Study. *Acta Neuropathologica*, **138**, 885-900. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02061-5>
- [9] Guerrini, R., Cavallin, M., Pippucci, T., et al. (2021) Is Focal Cortical Dysplasia/Epilepsy Caused by Somatic MTOR Mutations Always a Unilateral Disorder? *Neurology Genetics*, **7**, e540. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000540>
- [10] Jesus-Ribeiro, J., Pires, L.M., Melo, J.D., et al. (2021) Genomic and Epigenetic Advances in Focal Cortical Dysplasia Types I and II: A Scoping Review. *Frontiers in Neuroscience*, **14**, Article ID: 580357.

- <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.580357>
- [11] Jansen, L.A., Mirzaa, G.M., Ishak, G.E., *et al.* (2015) PI3K/AKT Pathway Mutations Cause a Spectrum of Brain Malformations from Megalencephaly to Focal Cortical Dysplasia. *Brain*, **138**, 1613-1628. <https://doi.org/10.1093/brain/awv045>
- [12] Greig, L.C., Woodworth, M.B., Galazo, M.J., *et al.* (2013) Molecular Logic of Neocortical Projection Neuron Specification, Development and Diversity. *Nature Reviews Neuroscience*, **14**, 755-769. <https://doi.org/10.1038/nrn3586>
- [13] Vecchi, M., Barba, C., De Carlo, D., *et al.* (2016) Symptomatic and Presumed Symptomatic Focal Epilepsies in Childhood: An Observational, Prospective Multicentre Study. *Epilepsia*, **57**, 1808-1816. <https://doi.org/10.1111/epi.13574>
- [14] Bast, T., Ramantani, G., Seitz, A., *et al.* (2006) Focal Cortical Dysplasia: Prevalence, Clinical Presentation and Epilepsy in Children and Adults. *Acta Neurologica Scandinavica*, **113**, 72-81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00555.x>
- [15] Fauser, S., Strobl, H., Pantazis, G., *et al.* (2006) Clinical Characteristics in Focal Cortical Dysplasia: A Retrospective Evaluation in a Series of 120 Patients. *Brain: A Journal of Neurology*, **129**, 1907. <https://doi.org/10.1093/brain/awl133>
- [16] Wiwattanadittakul, N., Suwannachote, S., You, X., *et al.* (2021) Spatiotemporal Distribution and Age of Seizure Onset in a Pediatric Epilepsy Surgery Cohort with Cortical Dysplasia. *Epilepsy Research*, **172**, Article ID: 106598. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2021.106598>
- [17] Lamberink, H.J., Otte, W.M., Blümcke, I., *et al.* (2020) Seizure Outcome and Use of Antiepileptic Drugs after Epilepsy Surgery According to Histopathological Diagnosis: A Retrospective Multicentre Cohort Study. *The Lancet Neurology*, **19**, 748-757. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30220-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30220-9)
- [18] Lawson, J.A., Birchansky, S., Pacheco, E., *et al.* (2005) Distinct Clinicopathologic Subtypes of Cortical Dysplasia of Taylor. *Neurology*, **64**, 55. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000148647.55705.A3>
- [19] Giacomo, R.D., Martin, R., Mai, R., *et al.* (2019) Stereo-EEG Ictal/Interictal Patterns and Underlying Pathologies. *Seizure*, **72**, 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.10.001>
- [20] Kerber, L., *et al.* (2013) High Frequency Oscillations Mirror Disease Activity in Patients with Focal Cortical Dysplasia. *Epilepsia: Journal of the International League against Epilepsy*, **54**, 1428-1436. <https://doi.org/10.1111/epi.12262>
- [21] Barba, C. (2021) Focal Cortical Dysplasia: An Update on Diagnosis and Treatment. *Expert Review of Neurotherapeutics*, **21**, 1213-1224.
- [22] 郭韬, 刘倩薇, 武江, 等. 脑磁图联合神经导航手术治疗局灶性皮层发育不良所致额颞癫痫[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(9): 1416-1419.
- [23] Chassoux, F., Rodrigo, S., Semah, F., *et al.* (2010) FDG-PET Improves Surgical Outcome in Negative MRI Taylor-Type Focal Cortical Dysplasias. *Neurology*, **75**, 2168-2175. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820203a9>
- [24] Wang, I., Oh, S., Blümcke, I., *et al.* (2020) Value of 7T MRI and Post-Processing in Patients with Nonlesional 3T MRI Undergoing Epilepsy Presurgical Evaluation. *Epilepsia*, **61**, 2509-2520. <https://doi.org/10.1111/epi.16682>
- [25] Tahry, R.E., Santos, S.F., Vrielynck, P., *et al.* (2020) Additional Clinical Value of Voxel-Based Morphometric MRI Post-Processing for MRI-Negative Epilepsies: A Prospective Study. *Epileptic Disorders*, **22**, 156-164. <https://doi.org/10.1684/epd.2020.1152>
- [26] 陈龙, 冯兆海, 姜磊, 等. MRI 阴性药物难治性颞叶癫痫的外科治疗[J]. 新疆医学, 2020, 50(6): 552-555.
- [27] Bourdillon, P., Rheims, S., Catenox, H., *et al.* (2019) Malformations of Cortical Development: New Surgical Advances. *Revue Neurologique*, **175**, 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.01.392>
- [28] Cobourn, K., Fayed, I., Keating, R.F., *et al.* (2018) Early Outcomes of Stereoelectroencephalography Followed by MR-Guided Laser Interstitial Thermal Therapy: A Paradigm for Minimally Invasive Epilepsy Surgery. *Neurosurgical Focus*, **45**, E8. <https://doi.org/10.3171/2018.6.FOCUS18209>
- [29] French, J.A., Lawson, J.A., Yapici, Z., *et al.* (2016) Adjunctive Everolimus Therapy for Treatment-Resistant Focal-Onset Seizures Associated with Tuberous Sclerosis (EXIST-3): A Phase 3, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *The Lancet*, **388**, 2153-2163. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31419-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31419-2)