

دکتر سعید مروتی ۱*

دکتر مسعود ثقفی نیا ۲

سارا امیرپور امرایی ۳

حسینی زاهد شکرایی ۳

نسترن شهبازی ۳

۱- دانشیار گروه ژنتیک انسانی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

۲- دانشیار گروه بیهوشی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

۳- کارشناس بیولوژی سلولی ملکولی، واحد پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی

* نشانی نویسنده مسؤول: خیابان ملاصدرا، تهران، ایران. صندوق پستی: ۱۹۳۹۵/۵۴۸۷

تلفکس: ۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳

نشانی الکترونیکی: morovvati@hotmail.com

مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، دوره ۳۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲: ۲۵۵-۲۵۰

• مقاله گزارش موردی کد مقاله: ۲۶

گزارش یک خانواده با دو مورد استئوپتروز با الگوی وراثتی اتوزومی مغلوب

چکیده

زمینه: در اختلال وراثتی و نادر استئوپتروز، کاهش عملکرد بازجذب استخوان منجر به ایجاد استخوان‌های اسکلتوتیک و شکننده و نیز از بین رفتن تدریجی فضای مغز استخوان و سوراخ‌های جمجمه‌ای می‌گردد. از بین رفتن تدریجی مغز استخوان عموماً با خون‌سازی خارج استخوانی و هپاتواسپلنومگالی همراه شده و منجر به آنمی و ترومبوسیتوپنی می‌گردد. تحت فشار قرار گرفتن اعصاب نیز به نایبایی و ناشنوایی تدریجی منتهی می‌گردد. استئوپتروز شدید کودکی یا بدخیم بدترین شکل بیماری است. در این مطالعه به معرفی دو بیمار مبتلا به استئوپتروز بدخیم در یک خانواده ایرانی پرداخته شده است.

روش کار: بیماران، فرزندان حاصل از یک ازدواج فامیلی هستند که در آن زن، نوه عمه شوهر می‌باشد. بیمار اول در ۱۲ روزگی دچار حملات تشنجی می‌شود. به تدریج بیمار دچار مشکلات و عفونت‌های تنفسی می‌گردد. در عکس‌های رادیوگرافی مچ دست و پا پهن گزارش شده است. در ۳ ماهگی بیمار در معاینه هپاتواسپلنومگالی داشته است. در نهایت علیرغم درمان، بیمار دچار برادی‌کاردی و ایست قلبی شده و فوت می‌نماید. بیمار دوم در مدت بستری دچار دو نوبت تشنج می‌گردد. عدم قرینه بودن چشم‌های شیرخوار در ۸ ماهگی آشکار می‌شود. در این زمان با گزارش چشم پزشک نایبایی تأیید می‌گردد. کودک تبار شده و با تشخیص استئومیلیت بستری می‌گردد و نهایتاً بدلیل پنومونی شدید فوت می‌کند.

نتیجه‌گیری: از آنجا که استئوپتروز اتوزومی مغلوب بیماری بسیار نادری می‌باشد، در گروه‌هایی که در آنها ازدواج فامیلی شایع‌تر است بیشتر دیده می‌شود. در این مقاله دو بیمار ایرانی مبتلا به استئوپتروز اتوزومی مغلوب که حاصل ازدواج فامیلی هستند معرفی شده‌اند.

واژگان کلیدی: استئوپتروز، اتوزومی مغلوب، ازدواج فامیلی

اسامی مختلفی تاکنون برای توصیف اختلال ارثی استخوانی استئوپتروز به کار رفته‌اند که عبارتند از بیماری آلبر- شونبرگ (Albers-Schönberg disease) به نام رادیولوژیست آلمانی که در سال ۱۹۰۴ برای اولین بار یک جوان ۲۶ ساله با اسکروز منتشر استخوانی و شکستگی‌های متعدد را شرح داد و بیماری استخوان صدفی (marble bone disease) به خاطر ظاهر استخوان که شبیه به صدف یا صخره است. [۱]

ماهیت دقیق این بیماری کاملاً شناخته شده نمی‌باشد اگر چه چندین ژن با این بیماری همراهی دارند. [۲] تصور آن است که در این بیماری تولید استخوان نرمال است ولی بازجذب استخوان کاهش یافته است و در نتیجه بافت شدیداً کلسیفیه می‌شود. اختلال در بازجذب استخوان سبب می‌شود که ساختار طبیعی استخوان دچار اختلال شده، کورتکس‌ها ضخیم گردیده، تراکول‌ها افزایش یافته و فضاهای مغز استخوان مورد تهاجم قرار گیرند، در نتیجه اختلال هماتولوژیک به واسطه آن ایجاد می‌شود. [۳] یکی دیگر از خصوصیات این بیماری هیپرکلسیمی کاسیون و شکننده شدن استخوان‌هاست و به همین دلیل شکستگی‌های استخوانی در این بیماری شایع هستند.

تاکنون چهار نوع از این بیماری توصیف شده است که عبارتند از:

الف) نوع نوزادی شدید یا بدخیم که با موتاسیون در ژن‌های TCIRG و C1CN7 همراه است، ب) استئوپتروز به همراه اسیدوز توبولر کلیوی و کلسیفیکاسیون های مغزی به دلیل نقص در آنزیم کربنیک انهیدریداز، ج) نوع خوش خیم یا بالغین که در آن ژن مسؤل در باند 11q12-13 قرار داشته و با کمترین عوارض همراه است و د) انواع بینابینی. [۲] در میان این چهار نوع از بیماری، نوع نوزادی شدید یا بدخیم که از بیماری‌های نادر ارثی می‌باشد با بیشترین عوارض همراه است. در این مقاله دو مورد از مبتلایان به این فرم از بیماری که فرزندان حاصل از یک ازدواج فامیلی می‌باشند و در آن زن، نوه عمه شوهر می‌باشد معرفی شده‌اند. (شکل ۱)

روش کار

بیمار اول: فرزند پسر، ماحصل زایمان طبیعی که با وزن موقع تولد ۳۰۰۰g متولد می‌شود. بیمار در ۱۲ روزگی دچار حملات تشنجی می‌شود که در پی خیرگی چشم‌ها، حرکات فوکال در صورت و اسپاستیک اندام‌ها مشاهده شده است. نوزاد تحت بررسی‌های بالینی قرار می‌گیرد که طی آزمایشات انجام شده بیماری فرد مذکور هاپوکلسمیک گزارش می‌شود. (۳.۵:Ca) بیمار تحت درمان و انفوزیون کلسیم قرار گرفته و در نهایت سطح خونی کلسیم به ۶/۵ رسیده و بیمار با بهبودی مرخص می‌شود. بیمار در بدو تولد آنمی و هپاتواسپلنومگالی نداشته است. به تدریج بیمار دچار مشکلات و عفونت‌های تنفسی می‌گردد. حدوداً ۲ سال پس از تولد به علت هایپرتروفی، لوزه‌ها تونسیلتکومی می‌گردد. در این مدت بیمار خوب وزن نگرفته و دچار thrive to Failure می‌گردد به طوریکه در ۲/۵ سالگی وزن بیمار ۹/۲۰۰Kg بوده است. در همین زمان مشکلات تنفسی بار دیگر شدت یافته و بیمار به علت سرفه، آبریزش بینی، دیسترس تنفسی و تب بالا (۳۹.۵: T) مجدداً در بیمارستان بستری می‌گردد. آزمایشات بیمار در هنگام بستری شامل: ESR: ۴۰، WBC: ۱۰۲۰۰، PMN (%): ۵۰ و HCT: ۳۳ بوده است. بیمار تحت درمان پنومونی و رینوسینوزیت حاد چرکی قرار گرفته و بهبود پیدا می‌کند. بیمار از بدو تولد نیستاگموس افقی داشته است و اندازه دور سر بیمار ۵۰Cm بوده است. بیمار CT اسکن می‌شود. اما از نظر آنومالی‌های CNS موردی پیدا نمی‌شود. در عکس‌های رادیوگرافی، مچ دست و پا پهن گزارش می‌شود. در حدود ۳ ماه بعد مجدداً بیمار دچار تب بالا، سرفه‌های شدید، بی‌حالی و افت سطح هوشیاری می‌شود که در بیمارستان بستری می‌گردد. در این زمان بیمار در معاینه هپاتواسپلنومگالی داشته و HCT: ۳۰ و PLT: ۶۱۰۰۰ گزارش گردیده است. به علت افت سطح هوشیاری بیمار اینتوبه شده و در ICU به Ventilator متصل می‌گردد. در نهایت علیرغم درمان، بیمار دچار برادی کاردی و ایست قلبی شده و فوت می‌نماید.

بیمار دوم: دختر و فرزند دوم همان خانواده می‌باشد. ماحصل زایمان طبیعی، قد ۴۰Cm، وزن ۳/۷۰۰Kg، دور سر ۳۵ Cm و آپگار طبیعی داشته است. رفلکس‌های نوزادی طبیعی بوده‌اند. در روز پنجم بیمار دچار هایپرپیلی‌روبینمی می‌شود و به علت زردی در بیمارستان بستری شده و به علت بیلی روبین بالا (Bil: 25) تحت درمان تعویض خون قرار می‌گیرد. CBC بیمار در این زمان از این قرار بود: WBC: 9100، Plt: 145000 و HCT: 43. در مدت بستری بیمار دچار دو نوبت تشنج می‌گردد که تحت بررسی‌های تشخیصی قرار گرفته و در آزمایشات متوجه سطح پائین کلسیم خون (Ca: 5) می‌شوند. در نتیجه بیمار تحت درمان قرار گرفته و پس از انفوزیون کلسیم با کلسیم ۷ مرخص می‌شود. مادر بیمار در ۸ ماهگی متوجه عدم قرینه بودن چشم‌های شیرخوار می‌شود. با معاینه و گزارش چشم پزشک نابینایی مشخص و تأیید می‌گردد. اگر چه در معاینه فوندوسکوپی انجام گرفته، هر دو شبکیه بیمار نرمال بوده است. بیمار طی این مدت وزن‌گیری خوبی نداشته (وزن در ۵ سالگی ۱۱kg) و دندان در نیاورده بود. در حدود ۴ سالگی ضایعه‌ای زخمی در ناحیه مندیبل راست پیدا می‌کند

که به تدریج دچار افزایش ترشح چرکی می‌شود. قطر ضایعه در ابتدا کوچک بوده که به تدریج بزرگتر شده و به قطری حدود یک سانتی‌متر رسیده و تورم در کنار زخم ایجاد می‌شود. کودک تباردار شده و با تشخیص استئومیلیت بستری می‌گردد و تحت درمان قرار می‌گیرد. در دوران بستری بیمار دچار سرفه و دیسترس تنفس شده که به تدریج شدیدتر می‌شود و نهایتاً بیمار دچار افت سطح هوشیاری می‌گردد. بیمار از نظر پنومونی بیمارستانی تحت درمان قرار می‌گیرد که نتیجه ای دربر نداشته و بیمار فوت می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

رشد و شکل‌گیری استخوان‌ها که در طی رشد و نمو مهره‌داران رخ می‌دهد، نیازمند فعالیت‌های دقیقاً متعادل شده سلول‌های استخوان‌ساز (استئوبلاست) و سلول‌های بازجذب‌کننده استخوان (استئوکلاست) است. به هم خوردن این تعادل می‌تواند منجر به کاهش توده استخوانی (استئوپوروز) و یا تجمع غیرطبیعی استخوانی (استئوپتروز) گردد. [۴] مورد اخیر با افزایش ژنرالیزه تراکم استخوانی همراه با نواقص شکل‌گیری در انتهای متافیزیال استخوان‌های بلند همراه بوده است که بطور تیپیک منجر به دیافیزها و متافیزهای پهن و کلفت می‌گردد. [۵] بیماری استئوپتروز بدخیم اتوزومی مغلوب یک اختلال مادرزادی نادر در بازجذب استخوان است. این بیماری ناشی از نقص عملکرد استئوکلاست‌ها در بازجذب استخوان‌های رشدنیافته و نابالغ است. این امر هم منجر به ایجاد استخوان‌های اسکروتیک متراکم و شکننده می‌گردد و هم باعث تنگی پیشرونده فضاها و مغز استخوانی و سوراخ‌های جمجمه‌ای می‌شود. از بین رفتن تدریجی مغز استخوان عموماً با خون‌سازی خارج استخوانی و هپاتواسپلنومگالی همراه شده و منجر به آنمی و ترومبوسیتوپنی می‌گردد. تحت فشار قرار گرفتن اعصاب نیز به نابینایی و ناشنوایی تدریجی منتهی می‌گردد. به همین خاطر است که شکستگی‌های مکرر استخوانی و عفونت‌ها از دیگر تظاهرات اصلی در این بیماری هستند. [۶] تولید سوپراکسید توسط WBC خون در این بیماری دچار اختلال است که این امر به همراه آنمی، سوء تغذیه و بستری‌های مکرر بیمارستانی سبب استعداد بیمار به عفونت می‌شود. این عفونت‌ها غالباً منشأ ویروسی دارند و سبب عفونت‌های تنفسی مزمن می‌گردند. [۷] پنومونی و سپتی‌سمی ناشی از آن از علل عمده مرگ و میر در این بیماران است و دو بیمار معرفی شده در این مقاله نیز به همین دلیل فوت شده‌اند. بیماران مبتلا به استئوپتروز بدخیم معمولاً در اولین سال زندگی و غالباً طی ۳ ماه اول علامت‌دار می‌شوند. از خصوصیات این بیماری مرگ و میر زودهنگام بیماران آن است بطوریکه تنها ۳۰٪ کودکان مبتلا تا ۶ سالگی زنده می‌مانند و بالاترین آمار مرگ و میر مربوط به دو سال اول زندگی است. بدون درمان سن مبتلایان به ندرت از ۲۰ سال تجاوز می‌کند. علت اصلی مرگ نارسایی شدید مغز استخوان و عفونت‌های مکرر ثانویه به آنمی و درگیری مغز استخوان است. [۸-۹]

شیوع بیماری استئوپتروز اتوزومی مغلوب حدود ۱ مورد در هر ۳۰۰ هزار تولد زنده است. این رقم در کاستاریکا که آمار بیشترین شیوع بیماری را داراست ۱۰ برابر بیشتر است. [۱۰] استئوپتروز در بسیاری از قومیت‌ها گزارش شده است اما شیوع آن در قومیت‌هایی که ازدواج فامیلی در میان آن‌ها رایج‌تر است مانند: کاستاریکا [۹]، کویت [۱۱] و عربستان سعودی [۱۲] بیشتر می‌باشد.

استئوپتروز از نظر ژنتیکی یک بیماری هتروژن است و چندین ژن انسانی در ایجاد آن دخیل می‌باشند. ژن TCIRG (T-immune cell-regulator) که در ۵۰ تا ۶۰ درصد بیماران دارای موتاسیون است منجر به نقص در زیرواحد A^3 از پمپ پروتون و اکسولر استئوکلاست می‌گردد. [۱۳-۱۴] این ژن در باند q11 ۱۳ واقع است. [۱۵] ژن VCLCN (Voltage Channel Chloride) که در ۱۰ تا ۱۵ درصد مبتلایان دارای موتاسیون می‌باشد، رمز کننده یک کانال کلریدی مخصوص استئوکلاست است. موتاسیون‌های این ژن سبب طیف وسیعی از فنوتیپ‌ها از بیمارانی با علائم شدید و زودرس گرفته تا افرادی تقریباً بدون علامت حتی در خانواده‌ای یکسان می‌گردند. [۱۶] استئوپتروز اتوزومی مغلوب همراه با اسیدوز توبولر کلیوی که درصد کوچکی از بیماران استئوپتروز را تشکیل می‌دهند ناشی از موتاسیون در ژن رمز کننده آنزیم کربونیک آنهیدراز ۲ (CAII) و نقص در تولید اسید کربونیک و پروتون است. [۱۷] در برخی بیماران نیز موتاسیون در ژن GL (Lethal-Grey) که رمز کننده یک پروتئین سیتوپلاسمی دخیل در عملکرد استئوکلاست است گزارش گردیده است. این موتاسیون نیز همانند موتاسیون قبلی تنها در درصد کوچکی از بیماران یافت شده است. [۱۸] لازم به ذکر است که در درصد قابل توجهی از بیماران مبتلا به استئوپتروز، موتاسیون مشخصی شناسایی نگردیده است. آنالیز ژن GL در دو بیمار کویتی، موتاسیون هموزایگوت بصورت حذف دو نوکلئوتیدی در اگزون ۲ این ژن که منجر به تغییر قالب خواندن و توقف پیش‌رس در ترجمه ژن شده بود را نشان داد. در یک بیمار لبنانی یک موتاسیون منفرد نقطه‌ای در اگزون ۱ این ژن که موتاسیونی بی‌معنی (nonsense) است یافت گردید. [۱۹] آنالیز ژن در یک خانواده پرتغالی مبتلا به استئوپتروز وجود موتاسیون هموزایگوت در ژن VCLCN را نشان داد. تعیین توالی ژن مذکور نشان داد بیماران مذکور برای موتاسیون‌های $\text{D}203\text{G}$ و $\text{Q}470\text{P}$ هموزایگوت بودند. [۲۰] در بررسی‌های انجام شده از ۹ بیمار کاستاریکایی وجود یک یا هر دو موتاسیون $\text{R}405\text{G}$ و $\text{L}444\text{R}$ به اثبات رسید. [۲۱]

از آنجا که در تعداد زیادی از بیماران مبتلا به استئوپتروز درجاتی از اختلال بینایی دیده می‌شود، لازم است که تمامی بیماران به محض تشخیص اقدام نموده و در فواصل معین توسط افتالمولوژیست اطفال مورد بررسی قرار گیرند. در کلینیک، اگرچه شبکه معمولاً دست نخورده است، ولی به طور معمول آتروفی اپتیک یافت می‌شود.

شود. پتانسیل‌های برانگیخته بینایی (VEPS) مفیدترین آزمون‌ها برای پایش درگیری عصب اپتیک هستند. [۲۲] در خصوص کاهش شنوایی در این بیماران که نسبت به اختلال بینایی از شیوع کمتری برخوردار بوده و در یک سوم بیماران رخ می‌دهد، لازم به ذکر است که اختلالات شنوایی معمولاً در سال اول تولد بروز می‌کند و به طور معمول پاتولوژی آن ترکیبی از تحت فشار قرار گرفتن عصب، اسکروز استخوانچه‌های گوش میانی و افزایش مژمن گوش میانی است. در این بیماران باید تعبیه زودرس لوله‌های تهویه (Ventilation Tube) در نظر گرفته شود. جهت درمان استئوپتروز کورتیکواستروئید، کلسی‌تریول با دوز بالا و اینترفرون به کار رفته‌اند. از مزایای درمان با کورتون و کلسی‌تریول استفاده آنها در کوتاه مدت می‌باشد. استفاده از اینترفرون می‌تواند جذب استخوانی، خونسازی و عملکرد لوکوسیتی را بهبود بخشد. [۲۳] تنها درمان این بیماری که به اثبات رسیده است پیوند مغز استخوان می‌باشد که به طور قابل ملاحظه‌ای سیر بالینی بیماری را تغییر می‌دهد. اگرچه اختلال بینایی در بیمار به ندرت تحت تأثیر پیوند قرار می‌گیرد، اما عوارض هماتوپوئیتیک کاملاً بهبود یافته و پروگنوز کلی بیماری مطلوب می‌شود. به همین علت پیش‌آگهی کلی بیماری وابسته به یافتن یک پیوند مناسب از نظر HLA می‌باشد. در مطالعه‌ای بهبود ۷۹ درصدی این بیماری در ۱۹ بیمار با یک پیوند HLA مناسب گزارش گردیده است. اما نتایج در بیمارانی که دهنده مناسب نداشتند زیاد امیدوار کننده نبود. بنابراین BMT باید برای بیمارانی در نظر گرفته شود که دهنده مناسب دارند. (۸)

مراجع

- 1- Worth HM. Principles and practice of oral radiologic interpretation. Year Book Publishers: Chicago, USA, 1963; pp.128–131.
- 2- Van Hul E, Gram J, Bollerslev J et al. Localization of the gene causing autosomal dominant osteopetrosis type I chromosome 11q12–13. J Bone Miner Res. 2002;17: 1111–1117.
- 3- Van Hul W, Vanhoenacker F, Balemans W, Janssens, De Schepper AM. Molecular and radiological diagnosis of sclerosing bone dysplasias. Eur J Radiol. 2001;40:198–207.
- 4- Albers-Schönberg HE. Röntgenbilder einer seltenen Knockenerkrankung. Munch Med Wochenschr 1904;51:365–8.
- 5- Shapiro F. Osteopetrosis. Current clinical considerations. Clin Orthop Relat Res. 1993;(294):34–44.
- 6- Gerristen EJ, Vossen JM, van Loo IHG, et al. Autosomal recessive osteopetrosis: Variability of findings at diagnosis and during the natural course. Pediatrics. 1994;93:247–253.
- 7- Reeves JD, August CS, Humbert JR, et al. Host defense in infantile osteopetrosis. Pediatrics 1979;64:202–6.
- 8- Gerristen EJA, Vossen JM, Fasth A, et al. Bone marrow transplantation for osteopetrosis. A report from the Working Party on Inborn Errors of the European Bone Marrow Transplantation Group. J Pediatr. 1994;125:896–902.
- 9- Loria-Cortes, R., Quesada-Calvo, E. and Cordero-Chaverri, C. Osteopetrosis in children: a report of 26 cases. J. Pediatr. 1977;91:43–47.
- 10- Fasth A, Porras O. Human malignant osteopetrosis: pathophysiology, management and the role of bone marrow transplantation. Pediatr Transplant. 1999;3:Suppl 1:102–7.
- 11- Abdel Al YK, Shabani IS, Lubani MM, et al. Autosomal recessive osteopetrosis in Arab children. Ann Trop Paediatr. 1994;14:59–64.
- 12- al-Rasheed S, al-Mohrij O, al-Jurayyan N, et al. Osteopetrosis in children. Int. J. Clin. Practice. 1998;52:15–18.
- 13- Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, et al. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. Nat Genet. 2000;25:343–346.
- 14- Kornak U, Schulz A, Friedrich W, et al. Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H⁺-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis. Hum Mol Genet. 2000;9:2059–2063.
- 15- Heinemann T, Bulwin GC, Randall J, et al. Genomic organization of the gene coding for TIRC7, a novel membrane protein essential for T cell activation. Genomics. 1999;1;57(3):398–406.
- 16- Kornak U, Kasper D, Bosl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, et al. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. Cell. 2001;104:205–215.

- 17- Sly WS, Hewett-Emmett D, Whyte MP, et al. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80:2752–2756.
- 18- Chalhoub N, Benachenhou N, Rajapurohitam V, et al. Grey-lethal mutation induces severe malignant autosomal recessive osteopetrosis in mouse and human. *Nat Med* 2003;9:399-406.
- 19- Pangrazio A, Poliani PL, Megarbane A , et al. Mutations in OSTM1 (grey lethal) define a particularly severe form of autosomal recessive osteopetrosis with neural involvement. *J Bone Miner Res*. 2006;21(7):1098-105.
- 20- Campos-Xavier AB, Saraiva JM, Ribeiro LM,et al. Chloride channel 7 (CLCN7) gene mutations in intermediate autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Genet*. 2003;112(2):186-9. Epub 2002.
- 21- Sobacchi C, Frattini A, Orchard P, et al. The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Mol Genet*. 2001;10(17):1767-73.
- 22- Stocks RM,Wang WC, Thompson JW,et al. Malignant infantile osteopetrosis: otolaryngological complications and management. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1988;124:689–94.
- 23- Key LL, Rodriguiz RM, Willi SM, et al. Long term treatment of osteopetrosis with recombinant human interferon. *N Engl J Med* 1995; 332: 1594–9.