

Koyunlarda Metabolizma Kafesinde Tutulmanın Bazı Fizyolojik Parametreler Üzerine Etkileri

Fahrünisa CENGİZ* Murat YALÇIN**

Geliş Tarihi: 23.10.2000

Özet: Bu araştırma 4 erkek Kızırcık tokluda stresin etkisini incelemek amacıyla yapılmıştır. Metabolizma kafesine konulmadan önce ve konulduktan 30 ve 60 dakika sonra alınan kan örnekleri hematokrit, hemoglobin, alyuvar sayısı, OAH, OAHb ve OAHbY, akyuvar sayısı, glikoz, total kolesterol ve total protein değerleri yönünden incelenmiştir. Yine aynı şekilde kafes öncesi ve sonrası rektal ısı ve kalp atım sayısı tespit edilmiştir.

Metabolizma kafesine konulmadan önce rektal ısı 38.3°C , kalp atım sayısı 73.5/dak., glikoz 46.00 mg/dl olarak bulunmuştur. Metabolizma kafesine konulduktan 30 ve 60 dakika sonra bu değerlerin $p<0.05$ oranında artış gösterdiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kızırcık koyun, stres, kan parametreleri

Effects of Keeping in Metabolism Cage on Some Physiological Parameters of Sheep

Summary: This study was carried out on four male one year old Kızırcık sheep to determine the effects of acut stress. Blood parameters were determined as follows hematocrit, hemoglobin, RBC, MCV, MCHb, MCHbC, WBC, glucose, total cholesterol and total protein values before keeping in metabolic cage and after 30 and 60 minutes. Rectal temperature and heart rate values were recorded aswell.

Average rectal temperature; 38.3°C , heart rate; 73.5/min and glucose; 46.00 mg/dl were recorded before keeping in metabolic cage. These values increased after keeping for 30 and 60 minutes in metabolic cage ($p<0.05$).

Key Words: Kızırcık sheep, stress, blood parameters

Giriş

Normal fizyolojik durumdan farklı şartlarda bulundurma hayvanlarda stres yaratır. Hayvanların bir yerden başka bir yere transportu, kapalı bir yerde tutulması, operasyonlar, enfeksiyonlar, zorlu egzersizler, ısı, hipoglisemi durumları stres yaratan etkenler olarak bilinmektedir. Çeşitli stres faktörleri hayvanlarda homeostazisin ve metabolizmanın değişmesine yol açar, hayvanların verim durumunu etkiler. Akut streslere cevap olarak kortizol salınınının artması, beden ısısının, kalp atım sayısının ve

glikoz seviyesinin yükselmesi ve bunun yanı sıra birçok hormonların etkilenmesi söz konusudur^{3,13,19}.

Koyunlarda yapılan araştırmalarda koyunları kapalı yerde tutmanın, bir yerden başka bir yere nakletmenin ve el sürmenin kalp atım sayısını büyük oranda etkilediği görülmüştür^{22,24}. Buzağılarda da nakledilme sırasında kalp atım sayısının etkilendiği vurgulanmaktadır¹⁴. Olumlu insan-hayvan ilişkisinin hayvanlarda immun yanıtı artttığı ve stresin yaratabileceği olumsuz sonuçları önleyebilecegi bildirilmektedir²³.

Levreklerde yapılan araştırmada akut

* Doç. Dr.; U.Ü. Vet. Fak., Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa – Türkiye

** Araş. Gör.; U.Ü. Vet. Fak., Fizyoloji Anabilim Dalı, Bursa – Türkiye

stresin deride ülserasyona neden olduğu²¹; Çok sayıda balığın dar bir alanda bulundurulmasının kalkanlarda glikoz miktarını artırdığı görülmüştür²⁷. Koyunlarda zorlu bir yürüyüşten sonra plazma glikoz miktarının arttığı belirlenmiştir⁴. Ponilerde yapılan araştırmada nakletme ve yürümenin benzer şekilde kalp atım sayısı üzerine etkili olduğu bildirilmiştir⁷. Kapalı bir yerde tutulan dağ koyunlarında vücut ısısı ve nötrofil sayısının artığı; hemoglobin, total lipid, kolesterol ve alyuvar sayısının ise çalışma periyodu sırasında zaman zaman azaldığı görülmüştür¹⁶.

Transportun etkilerini incelemek amacıyla koyunlarda yapılan araştırmada alyuvar sayısı, hematokrit, hemoglobin, trombosit ve lenfosit sayıları ve kolesterol değerinin transporttan sonra düşük, nötrofil sayısının ise yüksek olduğu saptanmıştır¹⁷. İneklerde ısı stresinin solunum ve kalp atım sayısını artırdığı ve süt verimini azalttığı açıklanmıştır¹³. Labrador Retrievers'larda zorlu bir egzersizden sonra rektal ısısının yükseldiği, alyuvar, akyuvar, segmentli nötrofil sayısı, hemoglobin, total protein ve hematokritin arttığı bildirilmiştir¹⁸. Koyunlarda yapılan araştırmada adrenalin uygulaması ile oluşturulan akut stresin hiperglisemi, hipomagnezemi ve hipokalemi ile ilgili olduğu bildirilmiştir²⁸.

Sonuç olarak fizyolojik parametrelerin, hayvanların stres ve refah durumlarının bir göstergesi olarak kullanılabileceği bildirilmektedir¹².

Stres durumuna ilaveten ruminantlarda kan değerleri üzerine yaşın da etkili olduğu ve yaşamın ilk dönemlerinde kan değerlerinin hızlı değişimler gösterdiği, yaşın ilerlemesiyle alyuvar sayısı, hemoglobin miktarı, hematokrit değer ve glikoz seviyesinin azaldığı bildirilmektedir^{15,26}. Hayvanlarda yaş ile birlikte ırk, beslenme, cinsiyet, çevre ısısı, su dengesi ve yükseklik gibi faktörlerin de kan değerleri üzerine etkili olduğu açıklanmaktadır^{5,25,29,31}.

Bu çalışmada akut stresin koyunlarda kan değerleri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Fakültemiz Araştırma Merkezinde konsantre ve kaba yem karışımı ile beslenen bir yaşlı dört erkek kıvırcık toklu kullanıldı. Hayvanlarda metabolizma kafesine konulmadan önce, metabolizma kafesine konulduktan 30 dakika ve 60 dakika sonra kan örnekleri alındı. Bu örnekler, hematokrit, hemoglobin, alyuvar sayısı, akyuvar sayısı, ortalama alyuvar hacmi (OAH), ortalama alyuvar hemoglobinini (OAhb), ortalama alyuvar hemoglobin yoğunluğu (OAhbY), glikoz, total kolesterol, total protein, albumin ve globulin değerleri yönünden incelendi. Kafese konulmadan önce ve sonra hayvanlarda termometre ile beden ısısı ve stetoskop ile kalp atım sayısını tespit edildi.

Hematokrit, hemoglobin, alyuvar sayısı, akyuvar sayısı, OAH, OAhb, OAhbY değerleri System 9000 Hematological Analyzer, Sereno marka hücre sayıcıda saptandı.

Glikoz, total kolesterol, total protein, albumin ve globulin değerleri Technicdon Dax 72 Auto Analyzer aygıtında gerçekleştirildi.

İstatistiksel analizler "SPSS 8.0" hazır paket programında yapıldı.

Bulgular

Kıvırcık koyunlarda kafes öncesi ve kafese konulduktan 30 ve 60 dakika sonraki beden ısısı ve kalp atım sayısına ait ortalama değerler ve standart hataları Tablo I'de; alyuvar, hematokrit, hemoglobin, OAH, OAhb, OAhbY, akyuvar sayısına ait değerler, Tablo II'de; glikoz, total kolesterol, total protein, albumin ve globulin değerleri ise Tablo III'de verilmiştir.

Tablo I. Kıvırcık koyunlarda kafes öncesi ve sonrası rektal ısısı ve kalp atım sayıları (n=4).

	REKTAL ISI (°C) X ± Sx	KALP ATIM SAYISI (dak) X ± Sx
Kafes Öncesi	38,3±0,3*	73,5±3,2*
Kafes Sonrası 30dak	39,2±0,2*	89,5±1,9*
Kafes Sonrası 60dak	39,4±0,1*	95,0±4,2*

* p<0,05

Tablo III. Kıvırcık koyunlarda kafes öncesi ve sonrası glikoz, total kolesterol, total protein, albumin ve globulin değerleri (n=4).

Tablo II. Kıvırcık koyunlarda kafes öncesi ve sonrası kan değerleri. (n=4)

	Akyuvar 10 ³ /mm ³ X ± Sx	Alyuvar 10 ⁶ /mm ³ X ± Sx	Hb g/100ml X ± Sx	Hematokrit % X ± Sx	OAH μ ³ X ± Sx	OAhb pg X ± Sx	OAhbY % X ± Sx
Kafes Öncesi	9,67±0,6	11,01±0,1	11,02±0,2	35,05±0,8	31,85±0,9	10,00±0,1	31,50±0,7
Kafes Sonrası 30 dak	9,55±0,6	10,82±0,5	10,65±0,4	33,52±1,9	31,45±1,1	10,00±0,1	31,85±0,7
Kafes Sonrası 60 dak	9,82±0,6	10,45±0,3	10,37±0,4	33,07±1,5	31,62±0,9	9,90±0,1	31,33±0,5

	Glikoz mg/dl $X \pm Sx$	T. Kolesterol mg/dl $X \pm Sx$	T. Protein g/dl $X \pm Sx$	Albumin g/dl $X \pm Sx$	Globulin g/dl $X \pm Sx$
Kafes Öncesi	46,00±1,7*	48,25±2,1	7,52±0,6	3,97±8,5	3,55±0,7
Kafes Sonrası 30 dak	55,75±2,1*	46,75±2,8	7,27±0,6	3,87±0,1	3,40±0,8
Kafes Sonrası 60 dak	58,75±1,4*	46,00±1,8	7,07±0,4	3,75±0,1	3,32±0,5

* p<0,05

Tartışma

Kalp atım sayısının metabolizma kafesine konulmadan önce 73.5/dak, kafese konulduktan 30 ve 60 dakika sonra 89.5, 95.0/dak olduğu saptanmıştır. Rektal ısı kafes öncesi 38.3°C kafese konulduktan 30 ve 60. dakikalar sonrasında ise 39.2 ve 39.4°C bulunmuştur. Bu farklılıklar p<0.05 düzeyinde istatistikî öneme sahiptir. Kalp atım sayısının koyunlara el sürme ile önemli derecede arttığı ve bu artışın birkaç saat devam ettiği bildirilmiştir¹⁰. Erkek buzağılarda yapılan araştırmada yükleme sırasında kalp atım sayısının önemli derecede arttığı¹⁴, ponilerde yapılan araştırmada ise transport ve yürümenin benzer şekilde kalp atım sayısını artttığı ve enerji tüketimi ile kalp atım sayısı arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmektedir⁷. Koyunlarda nakledilmenin etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada yükleme sırasında kalp atım sayısının arttığı bildirilmiştir²⁴. Kalp atım sayısının artmasının, strese karşı bir cevap olduğu kabul edilmektedir^{8-11,24}. Beden ısısının da koyunlarda yükleme sırasında artış gösterdiği ve nakledilme sırasında belirli aralıklarla yapılan ölçümlerde ömensiz derecede arttığı bildirilmiştir³. Bergamusca koçlarında yapılan araştırmada kalp atım sayısının ayakta tutulma sırasında arttığı; dağ koyunlarında ise kapalı yerde tutulmanın beden ısısını artttığı görülmüştür^{16,22}. Bu çalışmada metabolizma kafesinde rektal ısı ve kalp atım sayısının p<0.05 oranında arttığı görülmektedir. Stres faktörlerinin homeostazisin ve metabolizmanın değişmesine neden olduğu, akut streslere cevap olarak beden ısısının ve kalp atım sayısının arttığı ve bu artışların sempatik sinir sisteminin uyarılmasından kaynaklandığı bildirilmektedir^{8,13,19,20}.

Akyuvar sayısının metabolizma kafesine konulmadan önce 11.01x10³/mm³ olduğu, kafese konulduktan 30 ve 60 dakika sonunda düşüş gösterdiği görülmektedir. İstatistikî önemde

olmasa da hemoglobin ve hematokrit değerlerde de düşme görülmüştür. Koyunlarda yol stresinin etkisini incelemek amacıyla yapılan araştırmada transport süresince hematokrit değerin istatistikî önemde olmasa da azalma gösterdiği bildirilmiştir⁸. Koyunlarda yapılan çalışmalarda hematokrit değer Hamdani koçları için %36², Merinos kuzularında % 34.4⁶, Karagül koyunlarında %31.7¹, Ak-karaman kuzularda %26-38³⁰, İvesilerde %28.8, Kivircıklarda %26.7, Morkaramanlarda %24²⁹ olarak bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen kafes öncesi %35.05'lik değer, bu verilerin bazlarıyla benzer, bazlarından ise biraz yüksektir. Bu farklılıkların cinsiyet, yaş, çevre ısısı, ırk, beslenme ve yükseklik gibi faktörlere bağlı olabileceği bildirilmektedir^{15,25,26}.

Ortalama akyuvar hacmi (OAH), Ortalama Akyuvar Hemoglobini (OAhb) Merinos kuzularda 30.4 μ³ ve 8.8 pg⁶, Akkaraman erkek kuzularda OAH 26,2 μ³⁽³⁰⁾ olarak bildirilmiştir. Karayaka toklularında OAH 36.72 μ³, OAhb 12.05 pg, OAhbY %31.73 olarak bildirilmiştir⁵. Kafese konulmadan önce alınan kan örneklerinden elde ettiğimiz veriler bu bulgulara yakın görünümektedir; kafese konulduktan sonra ise ömensiz farklılıklar görülmüştür.

Akyuvar sayısı 9.67x10³/mm³ olarak bulunan koyunlarda; kafese konulduktan 30 dakika ve 60 dakika sonra istatistikî önemde bir farklılık görülmemiştir. Akyuvar sayısının koyunlar için bildirilen genel değerleri 7 ile 10x10³/mm³ değişim sınırlarındadır²⁵. Akyuvar sayısı Karagül koyunlarında 4.80-8.90x10³/mm³¹, Akkaraman kuzularda 6.4-13x10³/mm³⁽³⁰⁾ sınırlarında bulunmuştur. Nakledilme etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmada lenfosit değerlerinin nakledilmeden sonra düşük, nötrofil değerlerinin ise yüksek olduğu bildirilmiştir¹⁷. Labrador Retriever-larda yapılan çalışmada ise zorlu bir egzersizden sonra total akyuvar sayısının arttığı görülmüştür¹⁸. Olumlu insan-hayvan ilişkisinin hayvanlarda immun yanıtı artttığı ve stresin yaratabileceği olumsuz etkileri önleyebilecegi bildirilmektedir²³.

Glikoz değerleri kafes öncesi 46 mg/dl, kafeste ise 55.75 ile 58.75 mg/dl bulunmuştur. Aradaki fark p<0.05 düzeyinde önemli olup, stresin glikoz değerlerini artttığı görülmektedir. Koyunlarda 2 km'lik zorlu bir yürüyüşten sonra kan glikoz miktarının 3.99 mmol/l'den 4.23 mmol/l'ye yükseldiği bildirilmektedir⁴. Kalkanlarda ağlarda kalmanın stres oluşturduğu

ve plazma glikoz miktarının arttığı görülmüştür²⁷. Koyunlarda adrenalin uygulaması ile oluşturulan akut stresin önemli derecede hiperglisemiye neden olduğu bildirilmiştir²⁸. Levreklerde kapalı yerde tutulmanın deride ülserasyona neden olduğu, balıklara deneme amaçlı enjekte edilen adrenalinin de benzer lezyonlara yol açtığı görülmüştür. Bu bulgulara dayanarak stres durumlarında balıklarda fırsatçı deri patojenlerinin şiddetli enfeksiyonların gelişimine neden olduğu ileri sürülmektedir^{12,21}.

Kafes öncesi elde edilen 7.52 g/dl'lik total protein değeri, Merinos toklular için bildirilen 6.0-7.9 g/dl⁶, Norduz koyunlarda 7.23 g/dl³¹, Karayaka toklularında 7.55 g/dl⁵ olarak bulunan değerler ile benzerlik göstermektedir. İstatistikte önemde olmasa da total protein değerleri kafese konulduktan 30 dakika ve 60 dakika sonra düşüş göstermiştir. Albumin ve globulin miktarlarında da aynı şekilde düşüş gözlenmiştir. Labrador Retrieverlerde ise zorlu bir egzersizden sonra total protein değerlerinin arttığı bildirilmiştir¹⁸. Ancak stres altındaki koyunlarda total protein değerlerinin incelenmesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Total kolesterol değerleri kafes öncesi 48.25 mg/dl, kafese konulduktan 30 dakika sonra 46.75 mg/dl, 60 dakika sonra 46.00 mg/dl olarak bulunmuştur. Norduz koyunlarda normal şartlarda total kolesterol değeri 69.6 mg/dl³¹ olarak bulunmuştur. Koyunlarda yapılan çalışmada kapalı yerde tutulan koyunlarda kolesterol değerlerinin düşme gösterdiği bildirilmiştir¹⁶. Yine erişkin koyunlarda yapılan çalışmada nakilden sonra kolesterol değerlerinde önemli derecede düşme olduğu bildirilmiştir¹⁷.

Sonuç olarak, bu çalışmada akut stresin rektal ısı, kalp atım sayısı ve glikoz değerlerini önemli oranda arttırdığı görülmüştür. Diğer parametrelerde de istatistikte önemde olmasa da bazı farklılıklar saptanmıştır. Çalışmamızın bu konuda araştırma yapacaklara faydalı olacağı kanısındayız.

Kaynaklar

- BELGE F, YUR F, BİLDİK A, DEĞER Y, DEDE S. Karagül koyunlarında bazı kan parametrelerinin araştırılması. Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg 1997; 8(1-2): 43-46.
- BİLDİK A, YUR F, BELGE F, DEĞER Y, DEDE S. Hamdani koyunlarında bazı kan parametrelerinin araştırılması. Vet. Bil. Derg 1997; 13 (1): 17-21.
- BUCHENAUER D. Space required for sheep during transport. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift 1997; 104 (4): 135-139.
- BULLOVA M, VAGAC G, BERUSKA NM, GAJDOSIK N, BRANIKOVICOVA V. Effect of Plastovet and Ketobion on the blood biochemistry of sheep exposed to forced walking. Acta Zootecnica 1995; 50: 87-96.
- CENGİZ F, GALİP N. Karayaka Toklularda Bazı Kan Parametrelerinin Araştırılması. U.Ü. Vet. Fak. Derg 1999: 18 (1-2); 11-17.
- CENGİZ F, SÖNMEZ G. Konsantre yemle beslenen Merinos erkek kuzularda bazı kan parametreleri üzerinde çalışmalar. U.Ü., Vet. Fak. Derg 1992: 1 (11); 155-160.
- DOHERTY O, BOOTH M, WARAN N, SALTHOUSE C, CUDDEFORD D. Study of the heart rate and energy expenditure of ponies during transport. Veterinary Record 1997: 141 (23); 589-592.
- HAAL SJG, BROOM DM, GOODE JA, LLOYD DM, PARROTT RF, RODWAY RG. Physiological responses of sheep during long road journeys involving ferry crossings. Animal Science 1999: 69, 19-27.
- HALL SJG, FORSLING ML, BROOM DM. Stress responses of sheep to routine procedures changes in plasma concentrations of vazopressin, oxytocin and cortisol. Veterinary Record 1998: 142 (4); 91-93.
- HARGREAVES AL, HUTSON GD. The stress response in sheep during routine handling procedures. Applied Animal Behaviour Science 1990: 26; 83-90.
- HARGREAVES AL, HUTSON GD. Changes in heart rate, plasma cortisol and haematocrit of sheep during a shearing procedure. Applied Animal Behaviour Science 1990: 26; 91-101.
- HYDBRING E. Physiological variables as indicators of stress and well-being. Swedish University of Agriculture Sciences. 94pp ISBN 91-576-5458-1 (1998).
- ITOH F, OBARA Y, ROSE MT, FUSE H, HASHIMOTO H. Insulin and glucagon secretion in lactating cows during heat exposure. J.Anim.Sci 1998: 76; 2182-2189.
- JACOBSON LH, COOK CJ. Partitioning psychological and physical sources of transport-related stress in young cattle. Veterinary Journal 1998: 155 (2); 205-208.
- JELINEK P, ILLEK J, HELANOVA I, FRAIS Z. Biochemical and hematological values of the blood in rams during rearing. Acta Veterinaria Brno 1984: 53 (3-4); 143-150.

16. MARCO I, VINAS L, VELARDE R, PASTOR J, LAVIN S. The stress response to repeated capture in mouflon (*Ovis ammon*): Physiological, haematological and biochemical parameters. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1998; 45 (4); 243-253.
17. MARCO I, VINAS L, VELARDE R, PASTOR J, LAVIN S. Effects of capture and transport on blood parameters in free-ranging mouflon (*Ovis ammon*). *J. Zoo Wildl Med* 1997; 28 (4); 428-33.
18. MATWICHUK CL, TAYLOR SM, SHMON CL, KASS PH, SHELTON GD. Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. *American Journal of Veterinary Research* 1999; 60 (1); 88-92.
19. NAGVI SMK, HOODA OK, SAXENA P. Some plasma enzymes of sheep under thermal, nutritional and exercise stresses. *Indian Vet. J* 1991; 68; 1045-7.
20. NANDA AS, DOBSSO NH, WARD WR. Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinising hormone surge in dairy cows. *Research in Veterinary Science* 1990; 49 (1); 25-28.
21. NOGA EJ, BOTT S, YANG MS, AUTALION R. Acute stress causes skin ulceration in striped bass and hybrid bass (*Morone*). *Veterinary Pathology* 1998; 35 (2); 102-107.
22. PALESTRINI C, FERRANTE V, MATTIELLO S, CANAL E, CRENZI C. Relationship between behaviour and heart rate as an indicator of stress in domestic sheep under different housing systems. *Small Ruminant Research* 1998; 27 (2); 177-181.
23. PEDERSEN V, BARNETT JL, HEMSWORTH PH, NEWMAN EA, SCHIRMER B. The effects of handling on behavioural and physiological responses to housing in tetherstalls among pregnant pigs. *Animal Welfare* 1998; 7 (2); 137-150.
24. PORROTT RF, HALL SJG, LLOYD DM. Heart rate and stress hormone responses of sheep to road transport following two different loading procedures. *Animal Welfare* 1998; 7 (3); 257-267.
25. SCHALM OW, JAIN NC, CARROLL EJ. *Veterinary Hematology*, Lea-Febiger, Philadelphia (1975).
26. TENNANT B, HARROLD D, REIN A, GUERRA M, KENDRICK JW, LABA RC. Hematology of the neonatal calf: Erythrocyte and leukocyte values of normal calves. *Cornell Veterinarian* 1973; 64 (4); 516-532.
27. WARING CP, POXTON MG, STAGG RM. The physiological response of the turbot to multiple net confinements. *Aquaculture International* 1997; 5 (1); 1-12.
28. WITTWER MF, MOREIRA EM, KLEIN WR, BOHM WALD LH. The effect of adrenaline administration on the blood and urine mineral concentration in ewes. *Veterinaria Mexico* 1995; 26 (3); 209-213.
29. YAMAN K, MERT N, CENGİZ F, TANRIVERDİ M. Farklı irtifalarda yetiştirilen yerli koyunlarda hemoglobin tipleri, potasyum tipleri ve hematokrit değerler üzerinde araştırmalar. U.Ü. Vet. Fak. Derg 1990; 8-9; 111-117.
30. YILMAZ B, EMRE B. Akkaraman kuzularda bazı hematolojik araştırmalar. A.Ü. Vet. Fak. Derg 1981; 28; 1-4.
31. YUR F, BELGE F, BİLDİK A, ÇAMIŞ H. Norduz koyun ve keçilerinde hemoglobin tipleri, serum protein fraksiyonları ve lipoprotein seviyelerinin belirlenmesi. Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg 1998; 9(1).