



ARAŞTIRMA MAKALESİ

Etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş sığır embriyolarının transferinde çözündürme-transfer aralığının gebelik oranı üzerine etkisi

Şükrü Dursun^{1*}, Mehmet Köse², Mesut Kırbaş¹, Bülent Bülbül¹, Seyit Ümütlü¹

¹Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü, 42020, Konya, ²Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye
Geliş: 02.01.2014, Kabul: 12.02.2014
*sukrudursun70@hotmail.com

Özet

Dursun Ş, Köse M, Kırbaş M, Bülbül B, Ümütlü S. Etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş sığır embriyolarının transferinde çözündürme-transfer aralığının gebelik oranı üzerine etkisi.

Abstract

Dursun S, Kose M, Kirbas M, Bulbul B, Umutlu S. The effect of time between thawing and transfer of cryopreserved cattle embryos by ethylene glycol on pregnancy rates.

Eurasian J Vet Sci, 2014, 30, 2, 48-52
DOI:10.15312/EurasianJVetSci.201425917

Amaç: Bu çalışmada etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş sığır embriyolarının taşıyıcılara transferinde, embriyonun çözündürülmesinden transfer edilene kadar geçen sürenin gebelik oranı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Aim: In this study, it was aim to determine the rates of the effect of the lasting time from thawing-transfer until to transfer during transferring of cattle frozen embryos with ethylene glycol by direct transfer method on pregnancy rates.

Gereç ve Yöntem: Taşıyıcı olarak (n=56), kızgınlıkları (Östrüs) 14 gün arayla iki kez 0.150 mg d-cloprostenol enjeksiyonu ile senkronize edilen inekler kullanıldı. Embriyolar taşıyıcılara kızgınlık tespitinden 7 gün sonra (kızgınlık 0. gün) transfer edildi. Embriyolar 25°C'lik su banyosunda 25 saniye tutularak çözündürüldükten sonra taşıyıcılara 0-5 dk. (Grup 0-5, n=27), 6-10 (Grup 6-10, n=16) ya da 11-25 (Grup 11-25, n=13) dakika içinde korpus luteumun bulunduğu kornu uteriye ipsilateral olarak transfer edildi. Gebelik muayeneleri 28. günde ultrason cihazı kullanılarak yapıldı.

Materials and Methods: Recipients (n=56) were selected from the cows whose estrus were synchronized with two times injections of 0.150 mg d-cloprostenol 14 days intervals. Embryos were transferred into recipients 7 days after the detection of recipients estrus (estrus= day 0). After embryos were threated 25 seconds within 25°C water bath to thaved then they were transferred to the recipients in minutes as follows; 0-5 (Group 0-5, n=27), 6-10 (Group 6-10, n=16) or 11-25 (Group 11-25, n=13) which all embryos were transferred into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum. Pregnancy diagnosis were done on day 28 used by ultrasound.

Bulgular: Gebelik oranları G 0-5, G 6-10 ve G 11-25 gruplarında sırasıyla %59.3, %50 ve %23.1 olarak tespit edildi. Buna göre G 0-5 ve G 6-10 ile G 6-10 ve G 11-25 grupları arasında farklılık istatistiki açıdan önemsiz bulunurken (P>0.05), G 11-25 grubunda tespit edilen gebelik oranı G 0-5 grubuna kıyasla önemli düzeyde düşük bulundu (P<j0.05).

Results: Pregnancy rates were determined in 59.3%, 50% and 23.1% within G 0-5, G 6-10 and G 11-25 groups, respectively. Therefore, pregnancy rates were not statistically significant (P>0.05) between G 0-5 & G 6-10 with G 6-10 & G 11-25 while it was lower than the group of G 11-25 compared to the group of G 0-5 (P<0.05).

Öneri: Sonuç olarak, etilen glikol ile dondurulmuş embriyoların çözündürme işleminden sonra 10 dakika içinde taşıyıcılara transfer edilmesi gerektiği kanısına varıldı.

Conclusions: According to this study, frozen embryos by ethylene glycol should be transferred into recipients in within 10 minutes after thawing is concluded.

Anahtar kelimeler: Çözündürme-transfer aralığı, embriyo, transfer, inek, gebelik oranı.

Keywords: Thawing-transfer interval, embryo, transfer, cows, pregnancy rate.



Giriş

Dünyada embriyo transferi; taze (sıcak) transfer ya da embriyonun canlılığına zarar vermeyecek yöntemler kullanılarak dondurulan embriyoların çözdürülerek transferi şeklinde uygulanmaktadır. Hücre içine girmeyen yüksek molekül ağırlığına (sahip sakkaroz gibi) ya da hücre içerisine geçebilen düşük moleküller ağırlığına sahip (Etilen glikol) gibi kriyoprotektanların kullanıldığı tek aşamalı (one-step) dondurma yöntemleri sayesinde embriyo transfer işlemini oldukça kolaylaştırmıştır (Palasz ve Mapletoft 1996, Massip 2001). Sığırlarda embriyo dondurma yöntemlerinin gelişmesi embriyo transferinin yaygın olarak kullanılmasını sağlamış ve global çaplı ticari bir pazar oluşmasına da öncülük etmiştir. Sığırlarda bir yılda uygulanan 500.000 embriyo transferinin yarısından fazlası dondurulup çözdürülen embriyo transferleri oluşturmaktadır (Purcell ve ark 2005). Gelişmiş ülkelerde embriyo transferi hayvan ıslahında çok yaygın olarak kullanılmasına rağmen, ülkemizde sınırlı düzeyde yapılmaktadır (Sağırkaya ve Bağış 2003). Embriyo transferi, üstün genetik kapasite ve verim potansiyeline sahip olan, özel bakım-besleme şartlarında yetiştirilen donörlerden süperovulasyon uygulaması ile elde edilen embriyoların dondurulmasını ve senkronize edilmiş taşıyıcılara kalifiye bir teknisyen ile nakledilmesi aşamalarını içermesi nedeniyle maliyeti yüksek bir tekniktir (Gordon 2003). Dondurulmuş embriyoların transferinden elde edilen gebelik oranları, taze transfer uygulamalarına göre genel olarak daha düşük olmaktadır. Dondurulup çözdürülerek yapılan embriyo transferlerinde maliyetin daha da yükselmemesi için elde edilen gebelik oranının önemi artmaktadır (Hasler 2001, Martinez ve ark 2002).

Tek aşamalı embriyo dondurma yöntemleri çözdürme sonrası kriyoprotektan maddelerin uzaklaştırılmadan embriyonun transferine olanak sağladığından çözdürme hataları minimuma indirilmiştir (Dochi ve ark 1998). Embriyoların çözdürmeden sonra mümkün olan en kısa süre de doğal yaşama ortamı olan kornu uteriye bırakılması gereklidir. Transfer edilmek amacıyla dondurulmuş embriyoların kızgınlıkları senkronize edilmiş taşıyıcılara transferinden elde edilecek gebelik oranını etkileyen en önemli iki faktör; teknisyenin tecrübe düzeyi (Looney ve ark 2006, Machaty ve ark 2012) ve taşıyıcının üreme organlarının anatomik yapısının transfer için uygunluğudur (Hasler 2001, Machaty ve ark 2012).

Bu faktörlerin her ikisi de çözdürme-transfer aralığı üzerine doğrudan etkilidir. Embriyonun taşıyıcılara transferi esnasında manipülasyonların yoğun olarak uygulandığı serviksuteri ve kornuuteri gibi üreme organlarının anatomik olarak uygunluğu önemlidir. Serviks uterusunun kanalı (canalis cervicalis) mukozal katmanın oluşturduğu enine 3-5 fibröz halkanın birbiri üzerine dişli çarkları şeklinde kenetlenmesi nedeniyle özellikle diöstrüs döneminde sıkıca kapanmaktadır. Ayrıca kornu uteriler embriyo transferinin yapıldığı dönemde kontraktil olmayıp kendi üzerine kıvrılmaktadır (Alaçam 1997,

Pineda 2003). Bununla birlikte taşıyıcıların özellikle düvelerin %10'unda anatomik olarak transfer işlemine uygun olmadığı belirtilmektedir (Gordon 2005).

Teknisyen açısından bakıldığında ise embriyoların CL'ye göre ipsilateral kornunun apikal kısmına bırakılması ve bunun için transfer kateterinin serviks kanalı geçirilerek uygun kornuya yönlendirilmesi ve ilerletilmesi ve bu işlemlerin seri, ancak travma oluşturmayacak düzeyde hafif manipülasyonlarla yapılması gerektiği belirtilmektedir (Gordon 2005, Looney ve ark 2006).

Sunulan çalışmada etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş mükemmel/iyi kalite embriyoların çözdürülmesinden uterusu bırakılmasına kadar geçen sürenin gebelik oranı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada taşıyıcı materyal olarak Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen ve *Brucellosis*, *Vibriosis*, *Leptospirosis*, *Blue Tongue*, *Tuberculosis*, *Enzootic Bovine Leukosis*, *İnfeksiyon Bovine Pustular Vulvovaginitis* hastalıklarından arı olan 56 baş İsviçre Esmeri inek kullanıldı. Taşıyıcıların en az bir doğum yapmış ve son doğumunda herhangi bir sorun olmamış ineklerden seçilmesine özen gösterildi. Çalışmadaki taşıyıcılar enstitünün rutin bakım-besleme şartlarında serbest dolaşımly yarı açık ahırda aynı bölmede barındırıldı.

Taşıyıcıların kızgınlıkları 14 gün ara ile iki kez kas içi enjekte edilen 0.150 mg çift doz d-cloprostenol (Dalmazin®, Vetaş, İstanbul, Türkiye) enjeksiyonu ile senkronize edildi. İneklerin kızgınlıkları (östrüs=0. gün), ikinci enjeksiyondan sonra günde 3 kez 30 dakika süreyle yapılan gözlemlerle tespit edildi. Etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş mükemmel/iyi kalite embriyolar, taşıyıcılara östrüs siklusunun 7. gününde transfer edildi. Transfer günü taşıyıcılarda yapılan ultrason muayenesinde CL'nin büyüklüğü (en az 2 cm çapında olması kriter alındı) ve bulunduğu ovaryum (sağ-sol) tespit edildi. Embriyolar çözdürülmeden taşıyıcılara bağırsak peristaltliğini ve taşıyıcının hareketini azaltmak amacıyla lokal anestezi (lidokain HCl, 5-7 mL, Vilca-in®, Vilsan, Ankara, Türkiye) ile üst epidural anestezi yapıldı. Çözdürme işlemi, azot tankından çıkarılan dondurulmuş embriyo payetinin 5 sn havada tutulmasını takiben 25°C'deki su banyosunda 25 sn tutulmasıyla gerçekleştirildi. Çözdürme işleminden sonra payetler zaman geçirilmeden transfer kateterine yerleştirip payetin kapalı ucu yere paralel olarak kesildi. Transfer kılıfı payete takıldıktan sonra transfer işlemine geçildi. Bütün transferlerde embriyolar, CL bulunduğu taraftaki kornu uterusunun cranial 1/3-1/2'lik kısmına bırakıldı. Çözdürme-transfer aralığı; embriyo payetinin transfer kateterine yerleştirilmesinden kateterin pistolesinin itilmesine kadar geçen süre olarak hesap edildi. Tespit edilen sürelere



göre üç grup oluşturuldu. Transfer işlemi, birinci gruptaki taşıyıcılarda 0-5 dk. (Grup G 0-5, n=27), ikinci gruptaki taşıyıcılarda 6-10 dk (Grup G6-10, n=16), üçüncü grupta ise 11-25 dk (Grup G11-25, n=13) aralığında tamamlandı.

Taşıyıcıların gebelik muayeneleri 28. günde 7.5 MHz linearray transrektal prob kullanılarak ultrason cihazıyla (Scanner 480 Vet, Esaote Pie Medical, Maastrich, Hollanda) ile yapıldı.

Gruplarda tespit edilen gebelik oranlarının istatistiki karşılaştırılması ki-kare testiyle bilgisayar paket programında yapıldı (MINITAB, Release 12.1, Minitab Inc.).

Bulgular

Çalışmada G0-5, G6-10 ve G11-25 gruplarında elde edilen gebelik oranları sırasıyla %59.3 (16/27), %50 (8/16) ve %23.1 (3/13) olarak tespit edildi (Şekil 1). Buna göre G0-5 ve G6-10 grupları ve G6-10 ve G11-25 grupları arasındaki farklılık istatistikî açıdan önemsiz bulunurken ($P>0.05$), G0-5 grubundaki gebelik oranı G11-25 grubundan önemli düzeyde yüksek bulundu ($P<0.05$). Buna göre çalışmada gerçekleştirilen 56 embriyo transferinden genel olarak %48.2 (27/56) oranında gebelik elde edildi.

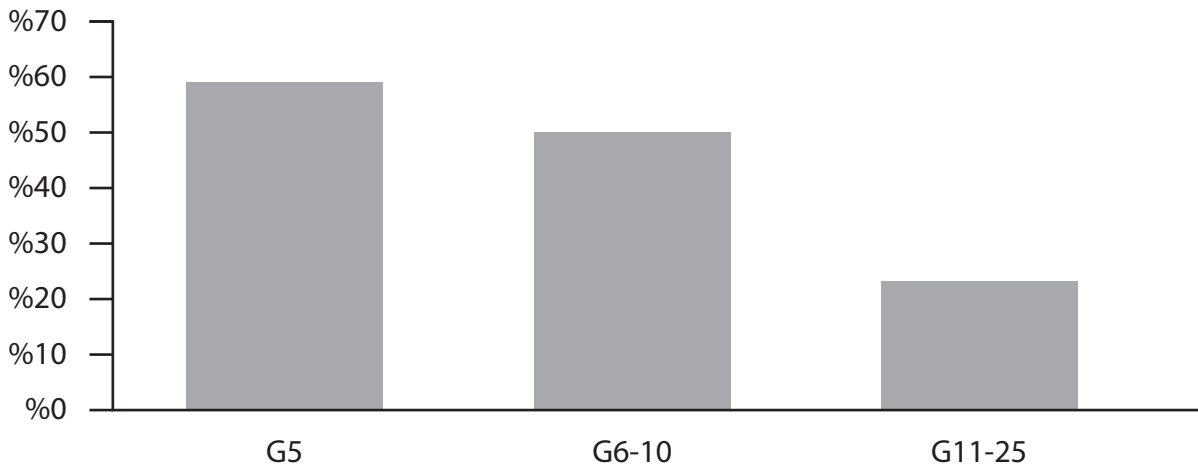
Tartışma

İneklerde non-şirurjikal embriyo transferi suni tohumlama uygulamasına benzemekle birlikte, diöstrüste yapılması ve üreme organlarında meydana gelen değişiklikler (organların kıvamı, boşluklarının açıklığı ve duruşu) nedeniyle farklılık arz etmektedir (Hasler 2001). Sunulan çalışmada mükemmel/iyi kalite embriyoların kızgınlık tespiti sonrası en az 2

cm çapında CL'ye sahip taşıyıcılara transfer edilmiştir. Embriyoların çözdürme-transfer aralığının gebelik oranı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Sunulan çalışmada çözdürme-transfer aralığının uzamasının gebelik oranı üzerine olumsuz etkisi olduğu tespit edildi. Bu sonuç çözdürme-transfer aralığının 11 dakikadan sonra gebelik oranının azaldığını bildiren Dochi ve ark (1998)'nin sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. Bo ve ark (2012) 6-16 dk arasında gerçekleştirilen transferlerde gebelik oranlarında bir değişme olmadığını bildirimle uyumlu bulunmamıştır. Ancak Bo ve ark (2012)'nin kullandığı transfer aralığının, sunulan çalışmaya göre daha geniş olduğu ve bu grupta gebelik oranının sayısal olarak azaldığı da dikkati çekmektedir.

Genital organlara yapılan manipülasyonlar $PGF_{2\alpha}$ salgısını artırmaktadır. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'nın embriyo üzerine toksik etkili olduğu ve çeşitli uyarımlara (temas, sinirsel ve yangısal vb.) bağlı olarak üreme organlarındaki değişik hücrelerden lokal olarak salgılandığı belirtilmektedir (Weems ve ark 2006). Bununla birlikte üreme organlarının elle manipülasyonu da bir travma etkisi oluşturduğundan yangısal bir sürecin başlamasına neden olabileceği belirtilmektedir. Yangısal reaksiyonların ilk aşamasında içerisinde prostaglandinlerle birlikte salınan sitokinlerin veya $PGF_{2\alpha}$ 'nın kendisinin endometriyal luteolizis olayını indükleyebileceği belirtilmektedir (Scenna ve ark 2005). Bu nedenle embriyo transferi sonrası gebelik oranlarının artırılması amacıyla uygulanacak stratejilerden birisi anti-luteolitik uygulamalardır. Bu uygulamaların esasını embriyo üzerine toksik olduğu bilinen $PGF_{2\alpha}$ 'nın üretiminin önlenmesidir (Güzeloğlu ve ark 2007). Daha önce yapılan bazı çalışmalarda embriyo transferi sonrası $PGF_{2\alpha}$ üretimini baskılayan flunixin meglumin gibi non-steroidal anti-inflamatuar madde uygulamalarının



Şekil 1. Etilen glikolle dondurulmuş sığır embriyolarının farklı zaman aralıklarında transferi sonrası elde edilene gebelik oranları.



gebelik oranlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (Purcell ve ark 2005, Scenna ve ark 2005). Dursun ve ark. (2007) ve Bülbül ve ark (2010) non-steroidal anti-inflamatuar maddelerin uygulanmasının gebelik oranlarında bir değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada çözdürme transfer aralığı uzadıkça gebelik oranının azalmasında etkili olan faktörlerden birinin kornu uterilerin düzeltilmesi amacıyla yapılan uzun manipülasyon süresidir. Manipülasyonların uzaması endometriyumda travmaya bağlı yangısal sürecin başlamasına neden olmaktadır. Tüm bu sebepler embriyo üzerine toksik etkili olan PGF_{2α}'nın fazla miktarda salınımına ve gebelik oranlarını olumsuz etkilenmiş olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca transfer kateterinin uterus içerisinde kalma süresi uzadıkça endometriyumun zarar görme ihtimalinin arttığı bunun neticesinde gelişen yangısal reaksiyon nedeniyle bölgeye savunma hücrelerinin ve eksudatın birikmesi söz konusu olacağı, uterus ortamının bozulmasına bağlı olarak gebelik oranının düşebileceği belirtilmektedir (Lones ve Lamb 2008). Nitekim Benyei ve ark (2006) güçlükle gerçekleştirilen transferlerde gebelik oranlarının düştüğünü bildirmişlerdir.

Transfer öncesi ve sırasında uterusun bakteriyel kontaminasyonun engel olmak amacıyla bütün hijyen kuralları uygulansa dahi uterusun kontamine olduğu ve kontaminasyona bağlı olarak şekillenen endometriyal yangısal reaksiyon nedeniyle gebelik oranlarının düştüğü belirlenmiştir (Hussain ve ark 1994). Sunulan bu çalışmada da serviksin geçilmesi ve/veya transfer kateterinin CL'nin bulunduğu kornuya yönlendirilmesi amacıyla tekrarlanan girişimlerin kontaminasyon riskini ve mikrobiyal yükünü artırmış olabileceği düşünülmektedir.

Dondurulma ile yaşamsal faaliyetleri minimal düzeye indirilen embriyoların çözdürme sonrası metabolik faaliyetleri normal düzeye gelmekle birlikte dondurma solüsyonunun etkisine maruz kalmaya başlamaktadırlar ve kalitelerinde azda olsa kötüleşmeye neden olur. Ancak dondurma öncesi 30 dk süreyle etilen glikole maruz bırakılsa dahi çözünme sonrası embriyoların yaşama gücünün etkilenmediği bildirilmiştir (Bo ve ark 2012). Embriyo payeti içerisindeki dondurma solüsyonunun çok az olması ve solüsyonun embriyonun beslenmesi için glikoz içermesi nedeniyle gebelik oranının embriyonun kriyoprotektan maddeye maruz kalma süresinden etkilenmediği düşünülmektedir.

Öneriler

Sonuç olarak etilen glikolle direkt transfer metoduna göre dondurulmuş embriyoların çözdürülmesi sonrası 11 dk içerisinde transfer edilmesi gerektiği kanısına varıldı. Bu nedenle embriyo transferi özellikle serviksin sıkıca kapalı olduğu ve uterus kontraksiyonunun zayıf olduğu ve mikrobiyal ajanlara ve travmalara daha duyarlı olduğu diöstrüs döne-

minde gerçekleştirilmektedir. Gebelik oranlarının transferleri gerçekleştirecek teknisyenin tecrübesi ile ilişkili olabileceği dikkate alınmalıdır.

Teşekkür

Bu çalışmanın bir bölümü 25-28 Ekim 2007 tarihleri arasında Antalya'da düzenlenen IV. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi (Uluslararası Katılımlı) sözlü bildiri olarak sunulmuştur. Bu çalışma TAGEM/HAYSÜD/02/01/02/01 Proje No'su ile mülga Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Alaşam E 1997. Üremenin Denetlenmesi. In, Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Ed Alaşam E, Birinci Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, Türkiye, pp: 59-68.
- Benyei B, Komlosi I, Peci, Pollott G, Marcos CH, Campos AO, Lemes MP, 2006. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Anim Reprod Sci*, 93, 268-279.
- Bülbül B, Dursun Ş, Kırbaş M, Köse M, Ümütlü S, 2010. Düvelerde embriyo transferi öncesi flunixin meglumin uygulamasının gebelik oranı üzerine etkisi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 1, 105-109.
- Bo GA, Baruselli PS, Mapletoft RJ, 2012. Increasing pregnancies following synchronization of bovine recipients. *Anim Reprod*, 9, 3, 312-317.
- Dursun Ş, Bülbül B, Kırbaş M, Köse M, Ümütlü S, 2007. Düvelerde embriyo transferi öncesi flunixin meglumin uygulamasının gebelik oranı üzerine etkisi. IV. Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 25-28 Ekim, 2007, Antalya, Türkiye
- Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata, Yamauchi A, Tomminaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S, 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 49, 1051-1058.
- Gordon IR, 2003. Laboratory production of cattle embryos, second edition, CAB International, Cromwell Press, Trowbridge, England, pp: 228.
- Gordon IR, 2005. Reproductive technologies in farm animals. CAB International, Cambridge.
- Güzeloğlu A, Erdem H, Sarıbay MK, Thatcher WW, Tekeli T, 2007. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. *Vet Rec*, 160, 12, 404-406.
- Hasler JF, 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56, 14011415.



- Hussain AM, Jillella D, Daniel RCW, Frost AJ, 1994. Studies on some bacteriological aspects of non-surgical embryo transfer in cattle. *Reprod Dom Anim*, 29, 55-60.
- Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW, 2006. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, 65, 201-209.
- Machaty Z, Peippo J, Peter A, 2012. Production and manipulation of bovine embryos: techniques and terminology. *Theriogenology*, 78, 937-950.
- Martinez AG, Brogliatti GM, Valcarcel A, de Las Heras MA, 2002. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology*, 58, 963-972.
- Massip A, 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim*, 36, 49-55.
- Palasz AT, Mapletoft RJ, 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14, 2, 127-149.
- Pineda MH, 2003. McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction, fifth edition, Blackwell Publishing Company, Iova, USA, pp: 298-301.
- Purcell SH, Beal WE, Gray KR, 2005. Effect of a CIDR insert and flunixin meglumine, administered at the time of embryo transfer, on pregnancy rate and resynchronization of estrus in beef cattle. *Theriogenology*, 6, 867-878.
- Sağırkaya H, Bağış H, 2003. Memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 22, 127-135.
- Scenna FN, Hockett ME, Towns TM, Saxton AM, Rohrbach NR, Wehrman ME, Schrick FN, 2005. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 78, 38-45.
- Weems CW, Weems YS, Randel RD, 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J*, 171, 206-228.

