

Quercetin Uygulamasının Egzersiz, Serbest Radikal ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Üzerine Etkisi

Mehmet GÖKTEPE¹, Mehmet GÜNAY²

¹İbrahim Çeçen Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu, Ağrı, TURKEY

²Gazi Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu, Ankara, TURKEY

mgoktepe06@gmail.com, mgunay@gazi.edu.tr

Özet

Bu çalışma, Quercetin uygulamasının egzersiz, serbest radikal ve antioksidan enzim düzeylerine etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Araştırma, 12 adet 300-350 gr. ağırlığında erkek Wistar rat üzerinde gerçekleştirilmiştir. Ratlar kontrol grubu (n=6) ve deney grubu (n=6) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Hayvanlar 10 gün karantina altına alındıktan sonra, deneyin 1. günü her bir rattan kalplerinden kan alınmış, deneyin 2. günü ratlara egzersiz uygulaması yaptırarak yine kan alınmıştır. Deneyin 3-12. günleri arasında (10 gün boyunca) deney grubundaki her bir rata günde 1 kez 20 ml/kg quercetin maddesi, kontrol grubundaki her bir rata ise 1ml/kg %0.05 Dimetil Sülfoksit (DMSO) gavaj yoluyla verilmiştir. Deneyin 13. günü her bir rata egzersiz uygulaması yaptırılarak kalplerinden kanları alınmıştır. Deneyin 14. günü hayvanlar istirahate bırakılarak 15. gün anestezi altında kalplerinden kanları alınmıştır.

Elde edilen verilerin analizinde iki bağımsız örnek t testi kullanılmıştır. Ratların quercetin maddesi verilmeden ve verildikten sonraki değişiklikleri incelenmiş, egzersizdeki laktat düzeyleri, antioksidan enzim düzeyleri (SOD,CAT,GPx,GST) ile lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyleri kontrol grubu ile deney grubu arasında karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Deneyin 1. günü istirahatte ve deneyin 2. günü egzersiz uygulamasında kontrol ve deney grupları arasında fazla bir fark gözlenmemiştir. Deneyin 3-12. günleri arasında 10 gün boyunca quercetin maddesi verildikten sonra egzersiz uygulanan ratların sonuçlarına göre anlamlı değişikliklerin meydana geldiği gözlenmiştir. MDA ve laktat miktarlarında anlamlı bir azalma söz konusudur (P<0,05). Antioksidan enzim düzeylerinde (SOD,CAT,GPx,GST) ise anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). Deneyin 14. günü hayvanlar istirahata bırakılıp, bir gün sonra alınan kan sonuçlarına göre MDA ve laktat düzeyleri incelendiğinde anlamlı bir fark bulunmamıştır (P>0,05). Antioksidan enzim düzeyleri (SOD,CAT,GPx,GST) incelendiğinde ise yine anlamlı bir artışın olduğu tespit edilmiştir (P<0,05).

Araştırmamızın sonucunda; Quercetin alımının, egzersizde laktat düzeyini frenleyerek performansı artırıcı etkisinin olduğu, Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA miktarını azaltarak serbest radikallere karşı koruyucu etkisinin olduğu ve antioksidan enzim düzeylerinin (SOD,CAT,GPx,GST) artışına neden olarak hücrenin antioksidan savunma sistemlerini güçlendirdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Flavonoidler, Quercetin, Egzersiz, Serbest Radikaller, Antioksidan Enzimler

The effect of quercetin administration on exercise, free radical and antioxidant enzyme levels

Abstract

This study was designed to investigate the effect of quercetin administration on exercise, free radical and antioxidant enzyme levels.

Material and Method: The research was conducted on 12 male Wistar rats weighing 300-350 gr. Rats were divided into two groups as control group(n=6) and test group(n=6). After the rats were quarantined for 10 days; each rat was heart bled on day 1 of the test, and bled again after they were made to exercise on day 2 of testing. Between day 3 and 12 of testing(for 10 days), each rat in test group was given 20 ml/kg of quercetin once daily, and each rat in control group was given 1ml/kg of 0.05% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) by gavage. On day 13, each rat was made to exercise and heart bled. On day 14, the animals were allowed to rest and on day 15, they were heart bled under anesthesia.

Two independent sample t test was used to analyze data. The changes before and after quercetin administration were studied, the lactat levels during exercise, antioxidant enzyme levels (SOD, CAT, GPx, GST) and malondialdehit (MDA) levels, the last product of lipid peroxidation, were investigated between control group and experimental group in comparison. No significant difference was detected between control group and experimental group on the 1st day during the rest and on the 2nd day during exercise. Between 3rd and 12th day of experiment, significant changes were observed according to the results in which the rats were administered with quercetin after the exercise. A significant decrease in MDA and lactat measures existed($P < 0,05$). A significant increase in the antioxidant enzyme levels (SOD, CAT, GPx, GST) was detected($P < 0,05$). On the 14th day, the animals were left to rest, and according to the results of blood test taken the next day, no significant difference was seen on MDA and lactat levels($P > 0,05$). When the antioxidant enzyme levels (SOD, CAT, GPx, GST) were tested, a significant increase was detected again($P < 0,05$).

It was detected that the Quercetin administration helps to increase performance by breaking lactat levels during the exercise; has protective effect against free radicals by decreasing MDA levels, the last product of lipid peroxidation, and strengthens the cell' s antioxidant defense systems by being result in increasing antioxidant enzyme levels (SOD, CAT, GPx, GST).

Key Words: Flavonoids, Quercetin, Exercise, Free Radicals, Antioxidant Enzymes

1. Giriş

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikal oluşumunun özellikle şiddetli egzersiz sırasında arttığına ve oksidatif hasarın kas, karaciğer, kan ve diğer dokularda oluştuğuna dair bulgular da mevcuttur (Ji. 1999, Ji et al. 1998, König et al. 2001, Urso et al. 2003). Egzersizin yoğunluğu ne kadar yüksek olursa, serbest radikal oluşumu da o kadar fazla olur (Palmer et al. 2003). Oksijen tüketiminin artmasına bağlı olarak artan serbest radikaller, enzimatik ve nonenzimatik antioksidanları içeren bir savunma sistemi tarafından nötralize edilir. Egzersiz, ROS ve antioksidanlar arasında oksidatif stres olarak adlandırılan bir dengesizlik oluşturur (Urso et al. 2003). Hücresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler içinde birincil olan antioksidan enzimler arasında SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz), GPx (glutasyon peroksidaz), GST (glutasyon -S- transferaz) bulunur (Aydın et al. 2001). Akut bir egzersiz bu enzimlerin aktivitelerini direkt etkileyebileceği belirtilmektedir (Ji. 1999). Enzimatik olmayan antioksidanlara ise vitamin E, vitamin C, glutasyon ve flavonoidler örnek olarak verilebilir (Aydın et al. 2001). Flavonoidler polifenollerin doğal yollardan oluşan en büyük gruplarından biridir. Birçok bitkide bulunurlar (Pikulski et al. 2003). Bir flavonol olan quercetin besinlerde (özellikle soğanda) bolca bulunur. Çay da flavonol ve flavon grubundan olan quercetin ve kaempferolden zengindir (Ayla et al. 2009). Quercetin, en önemli görevi metabolizmayı hızlandırmaktır (Ergüzel. 2006). Yukarıdaki bilgiler ışığında bu araştırmanın amacı; Quercetin uygulamasının egzersiz, serbest radikal ve antioksidan enzim düzeyleri üzerine etkisini araştırmaktır.

2. Materyal ve Metod

Quercetin uygulamasının egzersiz, serbest radikal ve antioksidan enzim düzeylerine etkisini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada denek olarak; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Bölümünden temin edilen 300-350 gr. ağırlığında erkek Wistar ratlar kullanılmıştır. Ratlar uygulama yapılmadan 10 gün önce karantina altına alınmıştır. Ratlar özel kafesler içerisinde bakılarak, standart laboratuvar diyeti ve su ile beslenmişlerdir. Ratlara 18- 22 oC oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık fotoperiyodu uygulanmıştır. Ratlar her kafeste 6 hayvan bulunacak şekilde yerleştirilmişlerdir. Uygulamalar Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup, çalışma protokolü Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar: quercetin (Flavonoid), Dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma-Aldrich markadır.

Hayvanlara Deneysel Uygulama Planı:

Ratlar kontrol grubu (n=6) ve deney grubu (n=6) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Uygulamalar sabah saatlerinde (09.00–10.00 arasında) aç olmayan ratlara yapılmıştır. Kontrol grubunda her bir rata günlük olarak 1 ml/ kg v.a. (vücut ağırlığı) % 0,5 Dimetil Sülfoksit (DMSO) oral gavaj yoluyla verilmiştir. Deney grubunda her bir rata ise günlük 20 mg/kg v.a. quercetin %0,5 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek oral gavaj yoluyla verilmiştir.

Çalışma Planı:

10 gün karantinanın ardından; Deneyin 0. günü hayvanlar istirahata bırakılmıştır. Deneyin 1. günü her bir rattan kalp kanı alınmıştır. Deneyin 2. günü her bir rata egzersiz uygulaması

yaptırılarak kalplerinden kan alınmıştır. Deneyin 3-12. günleri arasında (10 gün boyunca) her sabah 9.00-10.00 saatleri arasında uygulama grubundaki her bir rata günde 1 kez 20 mg/kg v.a. Quercetin %0,5 Dimetil Sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek verilmiştir. Kontrol grubundaki her bir rata ise 1ml/kg %0.05 Dimetil Sülfoksit (DMSO) gavaj yoluyla verilmiştir. Deneyin 13. günü her bir rata egzersiz uygulaması yaptırılarak kalplerinden kan alınmıştır. Deneyin 14. günü hayvanlar istirahata bırakılmıştır. Deneyin 15.günü hayvanlar anestezi altında kalplerinden kanları alınmak suretiyle feda edilmiştir.

Deneklere Yaptırılan Yüzme Egzersizi:

Deneyin 2. ve 13. günü hayvanlar 80x60x60 cm ebatındaki havuz içerisinde yoruluncaya kadar yüzdürülerek yüzme egzersizi gerçekleştirilmiştir. Bu esnada hayvanların yorgunluğunun gerçekleşmesi sağlanmıştır.

Egzersiz Protokolü:

Ratlar 28 °C derecedeki suda yoruluncaya kadar yüzdürüldü. Koordinasyonsuz hareketlerin başlaması (hayvanın su üzerinde kalmasını sağlayamayan küçük ekstremite hareketleri), su altında 10 saniye boyunca yüzmeden kalma ratlardaki yorulma kriteri olarak kabul edildi (Meisler ve ark. 1983, Schirmer. 1989).

Biyokimyasal Analizler:

Eritrositlerin Hazırlanışı; Deneyin 1. 2. ve 13. günlerinde her gruptaki hayvanların kalplerinden heparinli tüpler içerisine kanları alındı. Deney bitimi olan 15. günde de her gruptaki deney hayvanlarının kalplerinden vakuteynir yardımıyla heparinli tüpler içerisine kanları alınarak hayvanlar feda edildi. Alınan kan örneklerinde, eritrositler 1600 rpm. +4 C de 5 dk. santrifüj edilerek plazmadan ayrıldı. Daha sonra soğuk %0,9' luk NaCl solüsyonunda yıkandı. Süpernatant her yıkamadan sonra dikkatlice ayrıldı. Eritrositler pH 7,4 fosfat tamponunda süspanse edildi. Drabkin metoduna göre hemoglobin konsantrasyonu belirlendi. Hücre karışımları -20 C de 24 saat saklandı. Hücreler su ile ozmotik basınç farkı oluşturularak patlatıldı ve 2500 rpm. de 10 dk. santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan MDA seviyesi, SOD, CAT, GPx ve GST aktiviteleri spektrofotometrede (Shimadzu UV-1700, Japan) ölçüldü.

Malondialdehit (MDA) Miktarının Belirlenmesi; Malondialdehit miktarının belirlenmesi için Ohkawa ve arkadaşlarının (Ohkawa et al. 1979). kullandığı metot temel alınarak 532 nm'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona giren lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA miktarı ölçüldü. TBA ilave edilmiş olan karışımın spektrofotometrede 532 nm'de absorbansı okundu. Malondialdehit miktarı nmol/mg hemoglobin olarak verildi.

SOD Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi; Toplam SOD tayininde Marklund ve Marklund (Marklund et al. 1974). metodu kullanılarak pyrogallol'un 3 dakikada 440 nm'de alkali ortamda otooksidasyonu ile yükselen absorbans ölçüldü. Bir ünite toplam SOD aktivitesi pyrogallol' un otooksidasyonun % 50 inhibiyonuna sebep olan protein miktarı olarak hesaplandı. SOD aktivitesi U/mg hemoglobin olarak verildi.

CAT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi; Katalaz enziminin aktivite tayini Aebi (Aebi. 1984). tarafından belirtilen metod ile yapıldı. 240 nm'de H₂O₂'in parçalanmasını gösteren azalan absorbans ölçüldü. Birim zaman başına absorbansdaki değişimler katalaz aktivitesinin ölçümü olarak alındı. Enzim aktivitesi U/mg hemoglobin birimiyle verildi.

GPx Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi; Glutasyon peroksidaz tayini Paglia ve Valentine (Paglia et al. 1987) tarafından belirtilen metoda göre yapıldı. NADPH'ın Nikotinamid-adenin-dinükleotid fosfat (NADP)'a yükseltgenmesi 340 nm'de absorbansın azalmasına sebep olur, böylece dolaylı olarak GPx'in aktivitesinin tespitinde kullanılmaktadır. Bu karışımın üzerine hidrojen peroksit eklenerek enzimatik reaksiyon başlatıldı ve 3 dakika boyunca 340 nm'de absorbanslar okundu. GPx aktivitesi birim zamanda harcanan NADPH miktarı olarak hesaplandı ve enziminin spesifik aktivitesi U/mg hemoglobin olarak verildi. GST Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi; Glutasyon -S- transferaz tayini Habig ve ark. (Habig et al. 1974) tarafından geliştirilen metoda göre yapıldı. GST' nin bütün izozimleri için 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) substrat olarak kullanılmaktadır. Enzim aktivitesinin tayini için 340 nm' de absorbanslar okundu. Enzimin spesifik aktivitesi U/mg hemoglobin olarak verildi.

Laktat Analizi:

Deneklerin kan örnekleri YSI 1500 Sport Laktat Analizörü kullanılarak analiz edilmiş ve Laktat değerleri belirlenmiştir (Akça ve ark. 2010). Deneklerin dinlenik ve egzersiz sırasındaki kan laktat düzeylerinin ölçümü kalpten alınan kan ile ölçülerek kaydedilmiştir.

İstatistiksel Analizler:

Tezde kullanılan istatistiksel veriler Windows SPSS 15.0 bilgisayar programında değerlendirilmiştir. Veriler istatistiksel yöntemlerle test edilmeden önce normal dağılım varsayımını sağlayıp sağlamadıkları shapiro-wilk normallik testi ile sınanmıştır. Tüm verilerin normal dağılım varsayımını sağladığı sonucuna varılmıştır. Bu durumda kontrol ve quercetin gruplarının karşılaştırılması için iki bağımsız örnek t testi kullanılmıştır. Ayrıca tablolarda betimleyici (özet) istatistiklerde verilmiştir. ($P < 0.05$) değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. Bulgular

Ratlara uygulanan quercetin maddesinin egzersiz, serbest radikal ve antioksidan enzim düzeylerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

Tablo 1. Grupların istirahat ve egzersizdeki MDA düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki MDA düzeylerinin karşılaştırılması

		GRUP	N	X ± SD	T	P
		İstirahat	Kontrol	6		
	Deney	6	6,87 ± 1,22			
Egzersiz	Kontrol	6	18,94 ± 1,00	0,798	0,444	
	Deney	6	18,32 ± 1,60			
Quercetin+Egzersiz	Kontrol	6	17,86 ± 1,35	10,181	0,000**	
	Deney	6	9,99 ± 1,32			
Quercetin+Egzersiz Sonrası	Kontrol	6	14,76 ± 1,25	0,892	0,393	
	Deney	6	13,84 ± 2,19			
** (P<0,010) / * (P<0,050)						

Tablo 1’deki sonuçlara göre MDA düzeyleri için istirahatteki kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Egzersiz uygulamasındaki kan alımına ilişkin sonuçlara göre gruplar arasında yine anlamlı bir fark bulunmamıştır. Quercetin verildikten sonra egzersiz uygulanan ratların kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, MDA düzeyleri ölçülen kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($P<0,050$). Buna göre quercetin verildikten sonra egzersiz uygulanan ratlarda MDA miktarında bir azalma söz konusudur. Quercetin+egzersiz sonrası kan alımı sonuçlarına göre kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$).

Tablo 2. Grupların istirahat ve egzersizdeki laktat düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki laktat düzeylerinin karşılaştırılması

		GRUP	N	X ± SD	T	P	
LAKTAT (mmol/l)	İstirahat	Kontrol	6	0,76 ± 0,08	-2,081	0,064	
		Deney	6	0,91 ± 0,15			
	Egzersiz	Kontrol	6	4,62 ± 0,65	1,842	0,095	
		Deney	6	3,53 ± 1,29			
	Quercetin+Egzersiz	Kontrol	6	5,42 ± 1,40	3,930	0,003**	
		Deney	6	2,79 ± 0,84			
	Quercetin+Egzersiz Sonrası	Kontrol	6	0,87 ± 0,27	-0,285	0,785	
		Deney	6	0,90 ± 0,09			
	** (P<0,010) / * (P<0,050)						

Tablo 2’deki sonuçlara göre laktat düzeyleri için istirahatteki kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Egzersiz uygulamasındaki kan alımına ilişkin sonuçlara göre gruplar arasında yine anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Quercetin verildikten sonra egzersiz uygulanan ratların kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, laktat düzeyleri ölçülen kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($P<0,050$). Buna göre quercetin verildikten sonra egzersiz uygulanan ratlarda laktat miktarlarında bir azalma söz konusudur. Quercetin+egzersiz sonrası kan alımı sonuçlarına göre laktat düzeyleri ölçülen kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$).

Tablo 3. Grupların istirahat ve egzersizdeki SOD enzim düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki SOD enzim düzeylerinin karşılaştırılması

		GRUP	N	X ± SD	T	P
		İstirahat	Kontrol	6	670,26 ± 41,48	0,021
Deney	6		669,74 ± 43,41			
Egzersiz	Kontrol	6	593,39 ± 23,72	0,137	0,894	
	Deney	6	591,50 ± 24,19			
Quercetin+Egzersiz	Kontrol	6	605,23 ± 24,73	-7,238	0,000**	
	Deney	6	705,77 ± 23,36			
Quercetin+Egzersiz Sonrası	Kontrol	6	570,02 ± 34,87	-5,900	0,000**	
	Deney	6	685,81 ± 33,08			
** (P<0,010) / * (P<0,050)						

Tablo 3’deki sonuçlara göre SOD enzim düzeyleri için istirahatteki kan alınımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (P>0,050). Egzersiz uygulamasındaki kan alınımına ilişkin sonuçlara göre gruplar arasında yine anlamlı bir fark bulunmamıştır (P>0,050). Quercetin verildikten sonra ise egzersiz uygulanan ratların kan alınımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, SOD enzim düzeyleri ölçülen kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır (P<0,050). Quercetin+egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, SOD enzim düzeyleri ölçülen kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (P<0,050). Buna göre quercetin verildikten sonra egzersizdeki ve egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, SOD enzim miktarlarında bir artış söz konusudur.

Tablo 4. Grupların istirahat ve egzersizdeki CAT enzim düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki CAT enzim düzeylerinin karşılaştırılması.

		GRUP	N	X ± SD	T	P
		İstirahat	Kontrol	6	352,71 ± 29,37	0,531
Deney	6		344,45 ± 24,26			
Egzersiz	Kontrol	6	249,46 ± 27,35	-0,055	0,958	
	Deney	6	250,28 ± 24,13			
Quercetin+Egzersiz	Kontrol	6	257,37 ± 24,66	-6,510	0,000**	
	Deney	6	352,40 ± 25,89			
Quercetin+Egzersiz Sonrası	Kontrol	6	258,94 ± 27,56	-6,036	0,000**	
	Deney	6	352,07 ± 25,85			
** (P<0,010) / * (P<0,050)						

Tablo 4' deki sonuçlara göre CAT enzim düzeyleri için istirahatteki kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Egzersiz uygulamasındaki kan alımına ilişkin sonuçlara göre gruplar arasında yine anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Quercetin verildikten sonra ise egzersiz uygulanan ratların kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, CAT enzim düzeyleri ölçülen kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($P<0,050$). Quercetin+egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, CAT enzim düzeyleri ölçülen kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,050$). Buna göre quercetin verildikten sonra egzersizdeki ve egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, CAT enzim miktarlarında bir artış söz konusudur.

Tablo 5. Grupların istirahat ve egzersizdeki GPx enzim düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki GPx enzim düzeylerinin karşılaştırılması

	GRUP	N	X ± SD	T	P	
GPx (U/mg Hb)	İstirahat	Kontrol	6	41,16 ± 3,74	-0,528	0,609
		Deney	6	42,64 ± 5,75		
	Egzersiz	Kontrol	6	26,83 ± 2,75	-0,860	0,419
		Deney	6	29,21 ± 6,19		
	Quercetin+Egzersiz	Kontrol	6	26,54 ± 3,66	-6,118	0,000**
		Deney	6	41,27 ± 4,62		
	Quercetin+Egzersiz Sonrası	Kontrol	6	25,71 ± 3,01	-6,983	0,000**
		Deney	6	41,9 ± 4,81		
	** (P<0,010) / * (P<0,050)					

Tablo 5' deki sonuçlara göre GPx enzim düzeyleri için istirahatteki kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Egzersiz uygulamasındaki kan alımına ilişkin sonuçlara göre gruplar arasında yine anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Quercetin verildikten sonra ise egzersiz uygulanan ratların kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, GPx enzim düzeyleri ölçülen kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($P<0,050$). Quercetin+egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, GPx enzim düzeyleri ölçülen kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,050$). Buna göre quercetin verildikten sonra egzersizdeki ve egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, GPx enzim miktarlarında bir artış söz konusudur.

Tablo 6. Grupların istirahat ve egzersizdeki GST enzim düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki GST enzim düzeylerinin karşılaştırılması

		GRUP	N	X ± SD	T	P	
GST (U/mg Hb)	İstirahat	Kontrol	6	50,40 ± 4,10	2,225	0,0502	
		Deney	6	45,49 ± 3,52			
	Egzersiz	Kontrol	6	35,32 ± 3,46	-0,488	0,636	
		Deney	6	36,21 ± 2,77			
	Quercetin+Egzersiz	Kontrol	6	37,81 ± 1,96	-6,186	0,000**	
		Deney	6	47,95 ± 3,50			
	Quercetin+Egzersiz Sonrası	Kontrol	6	37,57 ± 2,31	-5,635	0,000**	
		Deney	6	47,86 ± 3,82			
	** (P<0,010) / * (P<0,050)						

Tablo 6' daki sonuçlara göre GST enzim düzeyleri için istirahatteki kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, kontrol ve deney grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Egzersiz uygulamasındaki kan alımına ilişkin sonuçlara göre gruplar arasında yine anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0,050$). Quercetin verildikten sonra ise egzersiz uygulanan ratların kan alımına ilişkin değerlerden elde edilen istatistiksel sonuçlar incelendiğinde, GST enzim düzeyleri ölçülen kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı bir farklılık vardır ($P<0,050$). Quercetin+egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, GST enzim düzeyleri ölçülen kontrol ve deney grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($P<0,050$). Buna göre quercetin verildikten sonra egzersizdeki ve egzersiz sonrası toparlanmadaki kan alımı sonuçlarına göre, GST enzim miktarlarında bir artış söz konusudur.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada quercetin'in serbest radikallere etkisinin, ratların MDA düzeyine etkisi ile tahmin edilmesi amaçlanmaktadır. Kontrol ve deney gruplarına quercetin maddesi verilmeden istirahat ve egzersizdeki MDA düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonra egzersizdeki ve toparlanmadaki MDA düzeyleri ölçülmüştür. Quercetin verilir egzersiz uygulanan ratların MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$).

Yapılan bir çalışmada quercetin verilen ratların, plazma MDA düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0,05$) (Kocabaş. 2008). Duarte ve ark. 5 hafta quercetin muamelesinden sonra ratlarda MDA seviyelerinin düştüğünü gözlemlemişlerdir (Duarte et al. 2001). Phachonpai ve ark. yaptıkları çalışmada ratlara uygulanan quercetin'in MDA düzeyinde azalmanın olduğunu gözlemlemişlerdir (Phachonpai et al. 2010). Singh ve ark. farelere 6 gün boyunca uyguladıkları quercetin'in MDA üretimini hafiflettiğini bulmuşlardır (Singh et al. 2011). Sriraksa ve ark. yaptıkları çalışmada 2 hafta uygulanan quercetin'in ratlarda MDA seviyelerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Sriraksa et al. 2012). Yao ve ark. yaptıkları çalışmada 3 hafta süreyle quercetin verdikleri ratlarda MDA düzeylerinin etkili bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir (Yao et al. 2011). Çiftçi ve ark. quercetin'in MDA seviyelerini indüklediğini bulmuşlardır (Çiftçi et al. 2011). Coşkun ve ark. quercetin uygulamasının ratlardaki MDA üretimini azalttığını ortaya koymuşlardır (Coşkun et al. 2005). Edremitlioğlu ve ark. ratlarda quercetin uygulamasının, MDA düzeyini azalttığını bulmuşlardır

(Edremitlioğlu et al. 2011). Pandey ve ark. yaptıkları çalışmada ratların beyin hasarına karşı quercetin ile ön tedavi yapıldığında MDA seviyelerinde belirgin bir azalmanın olduğunu belirtmişlerdir (Pandey et al. 2011). Zhang ve ark. tavuk spermatogonial hücre kültüründe quercetinle muamelenin MDA değerlerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir (Zhang. 2005). Alia ve ark. quercetin uygulamasının MDA düzeyini azalttığını bulmuşlardır (Alia et al. 2006). Adewole ve ark. yaptıkları çalışmada quercetin uygulanan ratların, MDA düzeyinde önemli ölçüde düşüş olduğunu bulmuşlardır (Adewole et al. 2007). Young ve ark. 1 hafta boyunca meyve suyu ile quercetin maddesi verdikleri insanların, MDA düzeylerinde azalma olduklarını bulmuşlardır (Young et al. 1999).

Yukarıda belirtilen çalışmalarda uygulanan quercetin maddesinin MDA düzeyinde azalmaya neden olduğunun bildirilmesi, Bu tez çalışmasındaki sonuçlarla paralellik göstermektedir. Quercetin grubunda düşük MDA değerleri quercetin serbest radikallere karşı koruyucu etkisine bağlanabilir.

Gai-ning' in yaptığı çalışmada detaylı bir egzersiz programı uygulanan ratlarda quercetin kas dokusunda etkisi araştırılmış ve MDA düzeyinin dikkat çekici bir şekilde azaldığı bulunmuştur (Gai-ning. 2006). Adewole ve ark. yaptıkları bir diğer çalışmada ise quercetin ve egzersizin birlikte uygulanmasının, MDA düzeyinde önemli ölçüde azaldığını bulmaları, bu tez çalışmasının sonuçlarını doğrudan desteklemektedir (Adewole et al. 2007).

Zhao ve ark. yaptıkları çalışmada iki hafta quercetin uygulanan ratlarda MDA düzeylerinde herhangi bir değişikliğin olmadığını tespit etmişlerdir (Zhoa et al. 2011). Benzer bir çalışmada 3 hafta quercetin ile zenginleştirilmiş diyetler ile beslenen ratların, lipid peroksidasyon seviyelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı bulunmuştur (Williams et al. 1998). Bu sonuçlar çalışmamızdaki sonuçlarla örtüşmemektedir.

Araştırmamızda ratlarda quercetin egzersize etkisinin, laktat düzeylerine etkisi ile tahmin edilmesi amaçlanmaktadır. Kontrol ve deney gruplarına quercetin maddesi verilmeden istirahat ve egzersizdeki laktat düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki laktat düzeyleri ölçülmüştür. Quercetin verilir egzersiz uygulanan ratların laktat düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p < 0,05$).

Smith ve ark. 3 hafta boyunca günde 1000 mg quercetin verilen bisikletçiler ve triatlon sporcularının %75 VO₂ peak seviyesi ve yukarıdaki egzersiz yoğunluklarında kan laktat düzeylerinin azaldığını bulmuşlardır (Smith et al. 2011). Gasparin ve ark. quercetin uygulamasının glukoz ve laktat üretimini önemli derecede azalttığını belirtmeleri (Gasparin et al. 2003) bu tez çalışmasının bulgularını desteklemektedir.

Su-juan ve ark. yaptıkları çalışmada quercetin yorucu yüzme egzersiz sonrasında laktat dehidrogenase artışını belirgin şekilde önleyebildiğini göstermiştir (Su-juan et al. 2007).

Baldassari ve ark. yaptıkları çalışmada, atlara quercetin dozu uygulandığında, koşma zamanlarında küçük fakat önemli artışlar tespit etmişler ve iyileşme sürelerinin önemli derecede kısaldığını bulmuşlardır (Baldassari. 2011).

Davis ve ark. koşu bandı egzersizi uyguladıkları farelere quercetin uygulamışlar. Farelerin kayıt altına alınan değerleri göz önüne alınarak maksimal dayanıklılık kapasitelerinde ($P < 0.05$), artış olduğunu tespit etmişlerdir (Davis et al. 2009).

Yukarıda belirtilen çalışmaların bulgularında quercetin egzersiz performansına olumlu etkilerinden söz edilmektedir. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre quercetin egzersizdeki

laktat düzeyini frenleyici etkisiyle dayanıklılığın geliştirilebileceği söylenebilir. Bu nedenle yukarıda belirtilen çalışmaların bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Araştırmamızda ratlarda quercetin antioksidan enzim düzeylerine etkisinin, tahmin edilmesi amaçlanmaktadır. Kontrol ve deney gruplarına quercetin maddesi verilmeden istirahat ve egzersizdeki antioksidan enzim düzeyleri ile quercetin maddesi verildikten sonraki egzersiz ve toparlanmadaki antioksidan enzim düzeyleri ölçülmüştür. Quercetin verilip egzersiz uygulanan ratların antioksidan enzim düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış söz konusudur ($p < 0,05$).

Gai-ning detaylı bir egzersiz eğitimi uygulanarak quercetin verilen ratların kas dokusunda SOD, CAT ve GPx enzim aktivitelerinin arttığını bulmuştur (Gai-ning, 2006). Adewole ve ark. yaptıkları çalışmada ise quercetin ve egzersizin birlikte uygulanmasının SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinde önemli ölçüde arttığını bulmaları (Adewole et al. 2007), bu tez çalışmasının sonuçlarını doğrudan desteklemektedir.

Phachonpai ve ark. yaptıkları çalışmada ratlara uygulanan quercetin SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinde artış olduğunu gözlemlemiştir (Phachonpai et al. 2010). Sriraksa ve ark. yaptıkları çalışmada 2 hafta uygulanan quercetin ratlarda SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir (Sriraksa et al. 2012). Çiftçi ve ark. quercetin, ratlarda antioksidan enzim aktivitelerinden SOD, CAT ve GPx seviyelerini pozitif yönde etkilediğini bulmuşlardır (Çiftçi et al. 2011). Singh ve ark. farelere 6 gün boyunca uyguladıkları quercetin SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinde önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır (Choe et al. 2006). Coşkun ve ark. quercetin uygulamasının ratlardaki SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinin arttığını ortaya koymuşlardır (Coşkun et al. 2005). Alia ve ark. quercetin SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinin arttığını bulmuşlardır (Alia et al. 2006). Adewole ve ark. quercetin uyguladıkları ratlarda SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinde belirgin şekilde artış olduğunu bulmuşlardır (Adewole et al. 2007). Ben Abdallah ve ark. quercetin uygulamasının SOD, CAT ve GPx enzim düzeylerinde artış olduğunu bulmuşlardır (Ben Abdallah et al. 2011).

GST' in quercetin ve egzersizle ilişkisi diğer antioksidan enzim aktivitelerinden daha az bir kapsamda çalışılmaktadır (Deaton et al. 2003). Singh ve ark. farelere 6 gün boyunca uyguladıkları quercetin, GST enzim düzeyinde önemli ölçüde arttığını bulmaları (Singh et al. 2011) bu tez çalışmasının sonuçlarını desteklemektedir.

Yukarıda belirtilen çalışmalar incelendiğinde quercetin, antioksidan enzim düzeylerini önemli derecede arttırdığının belirtilmesi, bu çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir. Çalışmamızdaki bulgular incelendiğinde; egzersizle beraber artan serbest radikaller ve hücrelerde oluşan oksidatif hasarlara karşı, quercetin uygulamasının hücrelerdeki antioksidan enzim düzeylerini arttırarak koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; Quercetin alımının, egzersizde laktat düzeyini baskılayarak performansı artırıcı etkisinin olduğu, Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA miktarını azaltarak serbest radikallere karşı koruyucu etkisinin olduğu ve antioksidan enzim düzeylerinin (SOD,CAT,GPx,GST) artışına neden olarak hücrenin antioksidan savunma sistemlerini güçlendirdiği tespit edilmiştir.

KAYNAKÇA

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 1984; 105: 121-126.
- Adewole SO, Caxton-Martins EA, Ojewole JAO. Protective Effect of quercetin on the Morphology of Pancreatic β -Cells of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2007; 4(1): 64–74.
- Akça F, Akalan C, Köz M, Ersöz G. Türk Elit Genç Kürekçilerde Oksijen Tüketimi ve Laktat Profilinin İncelenmesi. *Spor metre Beden Eğitimi ve Spor Bilimleri Dergisi*, 2010, VIII (2) 77-80
- Alía M, Mateos R, Ramos S, Lecumberri E, Bravo L, Goya L. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *Eur J Nutr*. 2006; 45(1): 19-28.
- Aydın A, Sayal A, İşimer A. Serbest Radikaller Ve Antioksidan Savunma Sistemi. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi No: 20; 2001.
- Ayla S, Oktar H, Tanrıverdi G. et al. Doksorubisin nedenli sıçan hepatotoksisitesine nikotinamidin koruyucu etkisi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2009; 10(1): 229-238.
- Baldassarı J. Effects Of quercetin On Exercise Potential And Exerciseinduced Cytokines In The Horse. Masters of Science. New Jersey: The State University of New Jersey; 2011.
- Ben Abdallah F, Zribi N, Ammar-Keskes L. Antioxidative potential of quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro. *Andrologia*. 2011; 43(4): 261-5.
- Choe E, Min DB. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2006; 46: 1-22.
- Coşkun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*. 2005; 51(2): 117-23.
- Çiftçi O, Vardı N, Özdemir I. Effects of quercetin and chrysin on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced hepatotoxicity in rats. *Environ Toxicol*. 2011; doi: 10.1002/tox.20707.
- Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B. quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 296(4): 1071-7.
- Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-associated oxidative stress, *Clin Tech Equine Pract*. 2003; 2(3): 278-291.
- Duarte J, Pérez-Palencia R, Vargas F, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2001; 133(1): 117-24.
- Edremitlioğlu M, Andiç MF, Sayın DB, Korkut O, Kısa Ü. quercetin, a powerful antioxidant bioflavonoid, attenuates renal dysfunction in long-term experimental diabetes mellitus. *Marmara Medical Journal*. 2011; 24(2): 88-99.

- Ergüzel E.T. quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon)'in Bakır (II) ve Çinko (II) Komplekslerin Kararlılık Sabitlerinin Tayini. Yüksek Lisans. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2006.
- Gai-ning D. Effect of quercetin on Free radical Metabolism in Muscle and Exercise Performance of Trained Rat. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*. 2006; 23(2): R24-33.
- Gasparin FR, Spitzner FL, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A, Constantin J. Actions of quercetin on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Xenobiotica*; 2003 Sep;33(9): 903-11.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*. 1974; 249: 7130-7139.
- Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1999; 222: 283-292.
- Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Fiebig R, Hollander J, et al. Oxidative stress and aging: role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann Ny Acad Sci*. 1998; 854:102-117.
- Kocabaş N. Homosisteinin İndüklediği Oksidatif Stres Üzerinde quercetin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans. Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2008.
- Konig D, Wagner KH, Elmadfa L, Berg A. Exercise And Oxidative Stress: Significance, of antioxidants with reference to inflammatory muscular and systemic stress. *Exerc. Immunol Rev*. 2001; 7: 108–133.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 1974; 47: 469-474.
- Meisler A, Anderson ME, Glutathione. *Ann. Rev. Biochem*. 1983; 52, 711-60.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979; 95: 351-358.
- Schirmer RH, Krauth-Siegel RL, Schulz GE. *Glutathione Reducase*, New York, John Wiley and Sons Press. 1989.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of glutathione peroxidase. *Journal Laboratory Medicine*. 1987; 70: 158-165.
- Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, Mcanulty SR, Mcanulty L, Swick, NS. et al. Influence of vitamin c supplementation on oxidative and salivary iga changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol*. 2003; 89: 100-107.
- Pandey AK, Hazari PP, Patnaik R, Mishra AK. The role of ASIC1a in neuroprotection elicited by quercetin in focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2011; 1383: 289-99.
- Phachonpai W, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tong-Un T, Preechagoon D. Neuroprotective effect of quercetin encapsulated liposomes: a novel therapeutic strategy against Alzheimer's disease. *American Journal of Applied Sciences*. 2010; 7(4); 480-485.

- Pikulski M, Brodbelt JS. Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2003; 14(12): 1437-53.
- Singh S, Singh SK, Kumar M, Chandra K, Singh R. Ameliorative Potential of quercetin Against Paracetamol-induced Oxidative Stress in Mice Blood. *Toxicol Int.* 2011; 18(2): 140-5.
- Smith JEW, Pirner M, Zachwieja Jeffrey JFACSM. quercetin Lowers Blood Lactate Response During Progressively Intense Exercise. *Medicine Science in Sports Exercis.* 2011; 43(5): 430.
- Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol K. Cognitive-enhancing effect of quercetin in a rat model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012: 823206.
- Su-juan C, Hai-ying L, Zheng-ying X. Effect of quercetin on hemoglobin and blood biochemical indexes in rats following exhausted exercise. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research.* 2007; 11 (37); 7468-7469.
- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003; 189 (1-2): 41-54.
- Yao F, Zhang R, Fu R, He W. Preventive and therapeutic effects of quercetin on hyperuricemia and renal injury in rats. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2011; 40(2): 175-7.
- Young JF, Nielsen SE, Haraldsdóttir J, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Crozier A, Sandström B, Dragsted LO. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69(1): 87-94.
- Zhang YM. Protective effect of quercetin on aroclor 1254-induced oxidative damage in cultured chicken spermatogonial cells. *Toxicol Sci.* 2005; 88(2): 545-50.
- Zhao L, Wu J, Yang J, Wei J, Gao W, Guo C. Dietary quercetin supplementation increases serum antioxidant capacity and alters hepatic gene expression profile in rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011; 236(6): 701-6.
- Williams MH, Branch JD. Creatine supplementation and exercise performance. *J Am Coll Nutr.* 1998; 17(3): 216-34.