

# MAGNOLIA BARK EKSTRAKTI UYGULAMASININ YAŞLI FARE KALP FONKSİYON YETERSİZLİĞİNDEKİ İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİ

## AMELIORATIVE EFFECTS OF MAGNOLIA BARK EXTRACT CONSUMPTION IN ELDERLY MICE CARDIAC DYSFUNCTION

Simge ÜNAY<sup>1</sup>, İrem AKTAY<sup>2</sup>, Belma TURAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı

### ÖZET

**AMAÇ:** Manolya ağacı (Magnolia) ekstraktının ek besin olarak kullanılmasının memelilerde çeşitli organlar ve dokular üzerinde anti-oksidan etkiler gösterdiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olmasına karşın, fizyolojik yaşlanma ile ilişkili olarak gözlenen kalp yetersizliklerinde koruyucu etkisi ile ilişkili bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle bu çalışmada, magnolol ve honokiol bileşenleri içeren manolya ağacı ekstraktı kompleksinin (MAHO-C) yaşlı farelerin (24 aylık) yetersiz kalp fonksiyonu üzerinde pozitif etkileri olup olmadığının incelenmesi hedeflenmiştir.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Bir grup yaşlı farelere (erkek BALB/c) standart fare yeminin yanı sıra MAHO-C (400 mg/kg/gün, 12 hafta boyunca oral olarak) takviyesi yapılırken, ikinci grup yaşlı farelere sadece standart yem ile beslenmiştir. Beslenme süresi bitiminde, farelerden in situ elektrokardiyogram (EKG) ölçümleri ve izole edilen kalp dokularında oksidatif stres ve antioksidan sistem parametrelerini kapsayan biyokimyasal analizler yapılmıştır.

**BULGULAR:** MAHO-C takviyesi alan yaşlı farelere ilişkin EKG'lerde yapılan analizlerde, takviye almamış yaşlı farelerle karşılaştırıldığında, P-dalgası süresi, QRS-kompleksi süresi ve QT-aralığı gibi önemli EKG parametrelerinde düşüşler ile kalp atım hızında artma gözlenmiş olup bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu gözlenmiştir. Kalp dokusunda yapılan biyokimyasal analizler, MAHO-C takviyeli yaşlı fare kalp dokularında arilesteraz aktivitesinde ve toplam antioksidan seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde artma gözlenmiştir. Ek olarak, ek takviye alan gruplarda almayanlarla karşılaştırıldığında, reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynağı olan mitokondriyal enzim süksinat dehidrogenazın aktivitesinde ve toplam oksidan seviyesinde oranında istatistiksel olarak azalmalar ile ATP/ADP oranında istatistiksel olarak artış gözlenmiştir.

**SONUÇ:** Verilerimiz, MAHO-C takviyesinin fizyolojik yaşlanma ile ilişki kalp yetersizliklerinde özellikle antioksidan savunma sistemini ve mitokondriyi etkileyerek kalbin hem elektriksel ve hem de biyokimyasal özellikleri üzerinde pozitif etkiler oluşturabildiğini göstermektedir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Antioksidan, MAHO-C, Bifenolik bileşikler, Yaşlanma, Oksidatif Stres.

### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** It has been shown that to use Magnolia tree bark extract as supplement nutrient provided an anti-oxidative effect in various mammalian tissues and organs by several studies, however, there is no data associated with its cardioprotective role in physiological aging-related heart disorders. Therefore, here, we aimed to investigate whether Magnolia tree bark extract, containing magnolol and honokiol components (MAHO-C), has positive effects on heart dysfunction from aged mice (24-month-old).

**MATERIAL AND METHODS:** One group of aged mice (male BALB/c) was fed with a standard mouse chow plus MAHO-C (400 mg/kg/day, for 12 weeks with intragastrical), while the second group of aged mice was fed only with the standard chow. Following the end of the supplementation period, in situ electrocardiogram (ECG) measurements and biochemical analyzes associated oxidative stress and antioxidant system parameters of the isolated heart tissues from all mice were performed.

**RESULTS:** When compared to the nonsupplemented aged mice, the analysis performed in the ECGs of the aged mice supplemented with MAHO-C showed statistically significant decreases in the durations of P-waves, QRS-complexes, and QT-intervals as well as increases in the heart rates. The biochemical analysis of the heart tissues showed that the activity of arylesterase and total antioxidant levels in the heart tissues of the aged mice supplemented with MAHO-C were significantly high compared to those of untreated aged mice. In addition, when compared to the nonsupplemented group, there were significant decreases in the activity of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, one of source of reactive oxygen species (ROS) and the total oxidant level with a significant increase in the ratio of ATP to ADP in the heart samples of the aged mice supplemented with MAHO-C.

**CONCLUSIONS:** Overall, our data suggest that MAHO-C supplementation provides significant positive effects on both electrical and biochemical properties of the insufficiently functioning hearts from the physiological aged mice, particularly through affecting the antioxidant defense system and mitochondria.

**KEYWORDS:** Antioxidant, MAHO-C, Phenolic compounds, Aging, Oxidative stress

**Geliş Tarihi / Received:** 25.05.2023

**Kabul Tarihi / Accepted:** 26.09.2023

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Prof. Dr. Belma TURAN

Lokman Hekim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Ana Bilim Dalı

**E-mail:** belma.turan@lokmanhekim.edu.tr veya belma.turan@medicine.ankara.edu.tr

**Orcid No (Sırasıyla):** 0000-0002-5582-5574, 0000-0002-7615-0123, 0000-0003-2583-9294

**Etik Kurul / Ethical Committee:** Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu (2019/100-10).

## GİRİŞ

Yaşlı birey popülasyonu tüm dünya ülkelerinde son yıllarda katlanarak artmakta ve günümüzde yaşlanmanın kronik hastalıkların oluşumunda ana risk faktörü olduğu kabul edilmektedir (1). Yaşa bağlı kronik hastalıklardan biri olan kardiyovasküler hastalıkların (KVH) görülme sıklığı giderek artmakta olup altında yatan mekanizmalar ve risk faktörleri tam olarak bilinmemektedir (2). Vücudumuzdaki fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin kombinasyonunun yaşlanma ile ilişkili olmasının yanı sıra, oksidan üretiminin artmasının ve antioksidan savunma sisteminin zayıflamasının da bu kombinasyonda önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (3).

Genetik faktörlerin yanı sıra, çeşitli moleküler ve hüresel değişiklikler de fizyolojik kalp yaşlanmasına katkıda bulunmaktadır (4). Hem klinik hem de deneysel çalışmalar, kalp yaşlanmasının esas olarak kalp hızında ve kalbin kasılma aktivitesinde önemli bir azalmanın yanı sıra elektrokardiyogramlarda (EKG) uzamış QT aralıkları ile karakterize olduğunu işaret etmektedir (5). Ayrıca, mitokondride fonksiyon bozukluğu gibi metabolik bozulmaların da yaşlı kalplerde önemli değişikliklere neden olabildiği işaret edilmektedir (6). Klinik gözlemler ve deneysel çalışmalar, bireylerin açlık kan şekeri seviyeleri ve vücut ağırlıklarının normal değerlerde olmasına rağmen, kalpteki belirgin fonksiyonel düşüş ile insülin direncinin gelişmesi arasında bir paralellik olduğunu göstermiştir (7, 8). Kalpte meydana gelen yetersizliklerin yaşlanma ile artışının kardiyomiyositlerin elektrofizyolojik aktivitelerindeki bozulmanın, mitokondride fonksiyon bozukluğu ile ilişkili oksidan miktarındaki artışla ilişkili olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur (9, 10).

Oksidatif stres ile yaşlanmaya bağlı hastalıkların gelişiminde önemli rol oynayan antioksidanlar arasında bir ilişki vardır (11). Antioksidan ve antioksidan benzeri ajanlar arasındaki dengesizlik, hüresel redoks dengesizliğine ve hüresel hasara neden olabilmektedir (12). Yaşlanmada kardiyomiyositlerin redoks durumundaki değişiklik ve oksidanlardaki artış, yapısal değişiklikler gibi hüresel bozukluğuna ve antioksidatif seviyelerinin azalması ile tetiklenen uyarma-kasılma eşleşmesindeki değişikliklere yol açmaktadır (13). Paraoksonaz ve arilesteraz

enzim aktivitelerindeki değişimin yaşlanmaya bağlı artan oksidatif stres üzerinde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu enzimlerin, endotel hasarı ve vasküler fonksiyon bozukluğu ile bağlantılı olan ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların fizyopatolojisi ile ilişkili olabileceğine ilişkin bazı çalışmalar mevcuttur (14).

Yaşlanmaya bağlı hastalıkların önlenmesinde antioksidanların kullanılmasına yönelik çalışmalar son yıllarda öne çıkmaktadır. Antioksidan takviyelerinin kalpteki oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (15). Antioksidan takviyelerin yararı üzerine önemli sayıda deneysel çalışmalar vardır. Ancak deney grupları arasındaki heterojen dağılım olması sebebiyle klinikte takviyelerin yararları ile ilgili henüz bir fikir birliği yoktur (16). Bu konuda geleneksel Çin ilaçlarının çeşitli hastalıkların tedavisi için *Manolya Officinalis* kabuğu da dahil olmak üzere doğal antioksidanlar için potansiyel kaynaklar olduğu gösterilmiştir (16, 17). Ayrıca, *Manolya Officinalis* kabuğunun başlıca biyoaktif bileşenleri olan magnolol ve honokiol hidrosile bifenolik bileşiklerin izomerleridir (18, 19). Zhao ve Liu çalışmalarında ROS üretimini kontrol altında tutmak ve DNA'yı korumak için manolol ve honokiol 'ün karşılaştırılabilir bir antioksidan yeteneği olduğunu göstermişlerdir (20). Ayrıca, *Manolya Officinalis* kabuğu özü takviyesinin büyüme ve hastalık direnci üzerindeki faydalarını göstermek için bazı hayvan çalışmaları yapılmıştır (21). Benzer şekilde, Zhang ve ark. yaptıkları çalışmada honokiol 'ün antihipertansif etkilerini *in vivo* spontan hipertansif sıçanlarda incelemişlerdir (19).

İleri yaştaki bireylerde, özellikle KVH'li kişilerde oksidatif stresteki belirgin artışı göz önünde bulundurarak, bu çalışmada aktif bileşenleri magnolol ve honokiol kompleksi içeren manolya kabuğu ekstraktının (MAHO-C) yaşlı farelerde uzun süreli uygulamasının kalp üzerindeki olası pozitif ve koruyucu etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Yaşlı farelerin elektriksel kalp fonksiyonu ile kalp dokularındaki oksidan ve antioksidanlar ve mitokondri enzim aktiviteleri incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Deney Grubunun Oluşturulması

Hayvanlar kafes başına 2-3 hayvan olacak şekilde barındırıldı ve standart yemle günlük olarak beslenmiş olup, tüm deneyler, Ankara Üniver-

sitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından belirlenen yönergelerle göre gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada erkek BALB/c tipi fareler (24 aylık; yaşlı fareler) kullanılmış olup, bu farelerin bir grubu standart hayvan yemlerinin yanı sıra aktif bileşeni magnolol ve honokiol kompleksi içeren bir manolya ağacı ekstraktı kompleksi (+MAHO-C grubu; 400 mg/kg/gün, oral yolla; n=7) 12 hafta boyunca beslenmiştir. İkinci grup yaşlı fareler ise, aynı süre boyunca sadece standart hayvan yemi ile ve serum fizyolojik ile beslenmiştir (n=7). Bu kompleks,  $\geq$ %2 honokiol içerecek şekilde standardize edilmiş saf bir toz olup, şeker, soya, süt ürünleri, maya, gluten ve diğer katkı maddelerini içermemektedir.

### Elektrokardiyogram Ölçümü

Hafif anestezi altında (intraperitoneal olarak; ketamin-ksilazin) farelerden yüzeysel elektrokardiyogramları (EKG) in situ olarak kaydedilmiştir. Ölçüm yöntemi kısaca, farelerin ön kol ve arka uzuvların 20 gauge iğneler yerleştirilmiş ve bipolar uzuv derivasyonu (derivasyon II) kullanılarak kayıtlar elde edilmiştir. Her hayvandan 10 dakika süreyle EKG kayıtları alınmış ve kaydedilen EKG verileri analogdan dijitale dönüştürücü olan BIOPAC MP35 (Goleta California) kullanılarak ve 50-500 Hz bir filtre high-cut (low-pass) ile elde edilmiştir. Her EKG kaydından P-dalgası, PR-aralığı, QRS-süresi, QT-aralığı ve kalp atım hızı gibi parametreler hesaplanmıştır.

### Biyokimyasal Analizler

Vücut ağırlıklarına bağlı intraperitoneal olarak ketamin-ksilazin uygulanan farelerin kalpleri hızlı bir şekilde vücuttan izole edildikten sonra daha sonraki incelemeler için sıvı azotta hızla dondurularak -80 °C'de saklanmıştır. Dokuları homojenize etmek için dondurulmuş olan kalpler sıvı nitrojenle ezilmiş ve 50 mM K<sub>2</sub>P<sub>4</sub> tamponu ile pH 7,4 olacak şekilde Ultra-Turax homojenleştirici ile homojenize edilmiştir. Homojenize süspansiyonlar önce 22.000 rpm/dk'da ve sonra 14.000 rpm/dk'da 20 dakika süreyle 4°C'de bir Sorvall RC-5B santrifüjü ile santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar biyokimyasal analizler için kullanılmıştır.

**Toplam oksidan ve antioksidan seviyelerinin ölçülmesi (TOS ve TAS):** Kalp dokusundan elde edilen süpernatantlarındaki TAS (22) ve TOS (23) se-

viyeleri, daha önce açıklandığı gibi ticari olarak temin edilebilen kitler (RL0024, Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. Analiz, spektrofotometrik olarak belirlenen örneklerde bulunan toplam oksitleyici moleküllerin tespiti ile gerçekleşmektedir. Örneklerin TOS seviyelerindeki değişiklikler  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/L ve TAS seviyelerindeki değişiklikler cinsinden  $\mu$ mol Trolox eşdeğeri/L ifade edilmiştir.

**Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin ölçülmesi:** Paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri ticari olarak temin edilen kitler (RL0031 ve RL0055, Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak ölçülmüştür. Paraokson hidroliz oranı, 37°C'de 412 nm'de absorpsiyon artışı izlenerek belirlenmiştir. Üretilen p-nitrofenol miktarı, 18.290 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>'deki molar absorpsiyon katsayısından hesaplanmıştır. Paraoksonaz aktivitesi, IU/mg protein olarak ifade edilmiştir. Arilesteraz aktivitesini belirlemek için fenilasetat kullanılmış ve enzimatik aktivite üretilen fenolün 1310 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>'deki molar absorpsiyon katsayısından hesaplanmıştır. Bir birim arilesteraz aktivitesi, yukarıdaki koşullar altında dakikada üretilen 1  $\mu$ mol fenol olarak tanımlanmış ve sonuçlar IU/mg protein olarak ifade edilmiştir (24).

**Süksinat dehidrojenaz aktivitesinin ölçülmesi:** Süksinat dehidrojenaz (SDH; mitokondriyal kompleks II) aktivitesi, literatür çalışmalarına göre ölçülmüştür (21). Homojenize edilmiş kalp dokusu örnekleri, Kompleks II Enzim aktivite analiz kiti (Abcam, ab109908) kullanılarak SDH aktivite ölçümleri için hazırlanmış ve bir kolorimetrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak bir SDH inhibitörü kullanılmıştır. Sonuçlar IU/mg protein olarak ifade edilmiştir.

**ATP'nin ADP'ye oranı seviyesinin ölçülmesi:** Sol ventriküler doku homojenatlarındaki ATP'nin ADP'ye oranı, bir ADP/ATP Oran Analiz Kiti (ab65313, abcam) kullanılarak belirlenmiştir. Kısaca, lusiferaz, ATP ve lucifer'in ışığa dönüşümünü katalize edilerek lüminometre kullanılarak ölçülmüştür. ADP seviyesi, daha sonra aynı reaksiyon kullanılarak tespit edilen ATP'ye dönüştürülmesiyle ölçülmüştür. Absorbanslar mikropilaka okuyucu (SpectraMax Plus384, USA) ile 570 nm'de okundu ve sonuçlar gruplar arasında kat değişimi olarak ifade edilmiştir (25).

## Etik Kurul

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2019-100-10 kararı ile onaylanmıştır.

## İstatistiksel Analiz

Verileri analiz etmek için Graph Pad Prism (Windows için Prism 5, GraphPad Software, ABD) kullanılmış ve parametrik olmayan istatistiksel veriler için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama  $\pm$  ortalamanın standart hatası ( $X \pm SEM$ ) olarak sunulmuştur.

## BULGULAR

### Hayvanların Genel Parametreleri

Yaşlı farelerin başlangıç vücut ağırlıkları  $30,9 \pm 2,1$  g aralığında olup, standart beslenmelerinin yanı sıra 12 haftalık MAHO-C takviyesini takiben, takviye edilen yaşlı farelerin ortalama vücut ağırlığı  $32,9 \pm 2,0$  g iken, takviye almayan yaşlı sıçanlarda  $33,1 \pm 2,1$  g ölçülmüştür Tablo 1. Gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı seviyede fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Yaşlı farelere MAHO-C takviyesi deney sonunda ölçülen açlık kan şekeri seviyesini takviye uygulanmayanlarla karşılaştırıldığında anlamlı seviyede etkilemediği gözlenmiştir (Tablo 1).

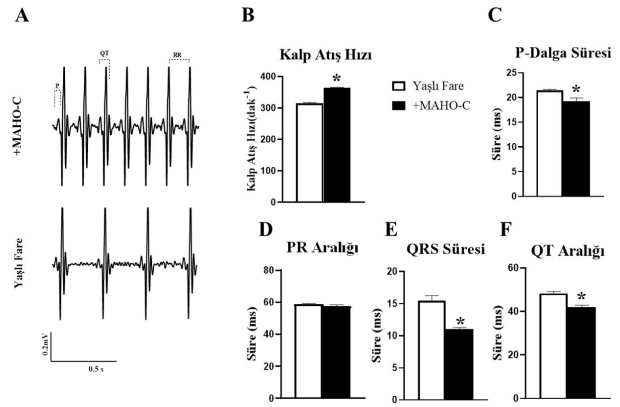
**Tablo 1:** Yaşlı Fare Kontrol ve MAHO-C Grupları Verileri

Gruplar/ Parametreler	Yaşlı Fare Grup (n=7; 24 aylık)	+MAHOC Grup (n=7; 24 aylık 12 hafta uygulama)
Vücut Ağırlığı (g)	$33.1 \pm 2.1$	$32.9 \pm 2.0$
Kan Glukozu (mg/dL)	$90.3 \pm 1.2$	$80.0 \pm 1.4$

### MAHO-C Uygulamasının Yaşlı Farelerin EKG Parametreleri Üzerindeki Etkileri

Tüm deney hayvanlarının in situ olarak kaydedilen EKG'leri analiz edilmiş ve sonuçlarımız Şekil 1'de ortalama ( $\pm SEM$ ) değerleri içeren bar-grafikler olarak sunulmuştur. Şekil 1A'da her bir gruptan kaydedilen orijinal EKG eğrileri verilmiştir. MAHO-C uygulanmış yaşlı farelerin uygulanmamış olan gruba göre kalp atım hızında artma olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı seviyede olduğu gözlenmiştir (Şekil 1B). Bunlara ek olarak bu gruptan elde edilen aynı EKG eğrilerinden ölçülen P-dalga süresinde takviye almayan gruba karşılaştırıldığında istatistiksel

olarak anlamlı seviyelerde kısalma gözlenmiştir (Şekil 1C). Ayrıca bu grubun EKG verilerinden yapılan ölçümlerde yine takviye yapılmayan grup ile karşılaştırıldığında, PR-aralığı süresinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede fark gözlenmezken (Şekil 1D), QRS-süresinde (Şekil 1E) ve QT-aralığı süresinde (Şekil 1F) kısaltmalar gözlenmiş olup gruplar arası farkların istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde olduğu gözlenmiştir.

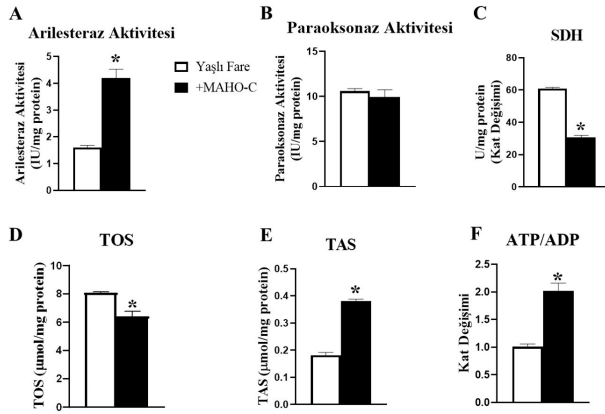


Şekil 1: MAHO-C takviyesinin EKG parametreleri üzerindeki etkileri. (A) Yaşlı farelerde (alt kısım), aktif bileşen MAHO-C (üst kısım) takviyesi alan deney gruplarının elektrokardiyogramları (EKG). Yaşlı ve/veya MAHO-C takviyesi almış farelerin kalp atış hızı (B), P-dalgası (C), PR-aralığı (D), QRS-süresi (E) ve QT-aralığı (F). Grafiklerdeki tüm değerler, grup başına 7 fareden elde edilmiş olup, barlar ortalama ( $\pm SEM$ ) olarak sunulmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır ve anlamlılık seviyesi \* $p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

### MAHO-C Uygulamasının Yaşlı Fare Kalplerinde Oksidatif Stres ve AntiOksidan Durumu Üzerindeki Etkileri

MAHO-C takviyesi alan ve almayan yaşlı farelerde izole edilmiş kalp dokularında elde edilen biyokimyasal parametreler Şekil 2'de sunulmuştur. Ortalama olarak değerlendirildiğinde, MAHO-C takviyesi alan yaşlı fare grubu kalp homojenatlarında takviye almayan gruba karşılaştırıldığında arilesteraz aktivitesinde artış gözlenirken ( $p < 0,05$ ) (A), paraoksonaz aktivitesinin değişmediği (B) gözlenmiştir. Ayrıca, MAHO-C takviyesi alan yaşlı grupta, takviye edilmemiş yaşlı gruba karşılaştırıldığında, kalp dokusu homojenatlarında bir mitokondri enzimi olan ve ROS'un üretim seviyesi ile yakından ilişkili olan süksinat dehidrojenaz (SDH; mitokondriyal kompleks II) aktivitesi (C) ile toplam oksidan seviyesinin (D) istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde daha düşük olduğu ölçülmüştür. Ayrıca, MAHO-C takviyesi alan yaşlı grupta ölçülen ATP/ADP oranının, takviye almamış yaşlı

farelerin verileri ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (Şekil 2F).



**Şekil 2:** MAHO-C takviyesinin yaşlı fare kalplerindeki antioksidan parametreleri üzerindeki etkileri. MAHO-C uygulamasının yaşlı farelere (+MAHO-C grubu) arilesteraz (A) ve paraoksonaz (B) aktiviteleri üzerindeki etkileri. Kalp dokusu homojenatlarında SDH aktivitesi (C), TOS (D), TAS (E) ve ATP/ADP seviyeleri (F). Grafiklerdeki tüm değerler, grup başına 7 fareden elde edilmiş olup, barlar ortalama ( $\pm$ SEM) olarak sunulmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanılmıştır ve anlamlılık seviyesi  $*p < 0,05$  olarak kabul edilmiştir.

## TARTIŞMA

Bu çalışma bulguları, ilk kez yaşlı farelerde bir magnolol kabuğu ekstrakt (MAHO-C) takviyesinin fizyolojik yaşlanmaya bağlı kalp yetersizliği üzerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde iyileştirici ve koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

Bu çalışma ile yaşlı farelerde iki ana bulgu gözlemlenmiştir:

**1)** Yaşlı fare kalplerinin elektriksel işlevi ve biyokimyasal parametreleri üzerinde MAHO-C takviyesi etkili olup, yavaş kalp hızlarında artış gibi etkiler olduğu gösterilmiştir.

**2)** MAHO-C takviyesinin etkisinin mitokondri ile ilişkili olabileceğini ve bu kapsamda enzim süksinat dehidrogenaz (SDH) ve ATP/ADP seviyelerinde kayda değer iyileşmeler gerçekleştiği gösterilmiştir.

Bulgularımız, öncelikle MAHO-C takviyesi almamış yaşlı farelerin EKG parametreleri literatür verileri kullanılarak aynı cins ve cinsiyette yetişkin farelerin verileri ile karşılaştırılmıştır. Yaşlı farelerin kalp atım hızının yetişkin fare literatür verileri ile karşılaştırıldığında ( $486 \pm 37$ /dak) anlamlı seviyede daha düşük olduğu, P-dalga süresinin, PR-aralığının, QRS-süresinin ve QT-aralığının ye-

tişkinlerden (sırası ile  $19.6 \pm 1.4$  ms,  $25.9 \pm 1.8$  ms,  $10.8 \pm 0.9$  ms ve  $42.3 \pm 3.0$  ms) daha uzun olduğu gözlenmiştir (26 - 29). MAHO-C uygulanmış yaşlı farelerin değerleri incelendiğinde yetişkin grubun değerlerine yaklaşmış oldukları görülmektedir. Bu bulgular, MAHO-C uygulamasının yaşlı kalplerde hem sinüs ritminde artışa hem de sol ventrikülde değişimlere neden olduğu gözlenmiştir. Özellikle QR-süresi ve QT-aralığı sol ventrikülde değişimi işaret ettiği için ve uzamış QT-aralığının aritmi olma riskini arttırdığı bildirildiği için MAHO-C bulgularımız sadece sinüs ritminin değil aynı zamanda sol ventrikül fonksiyonunun da etkilendiğini göstermiştir. Bulgularımız MAHO-C takviyesinin yaşlı farelerde görülen kalp fonksiyon yetersizliğini iyileştirdiği ve kalpte koruyucu etkilere sahip olduğunu vurgulamaktadır. Kalp dokusunda gerçekleştirilen biyokimyasal analizlerimiz, MAHO-C uygulamasının antioksidan benzeri etkiler oluşturduğu ve özellikle söz konusu etkilerin mitokondri hedefli olabileceğini de işaret etmektedir. Bu nedenlerle sonuçlarımız, fizyolojik yaşlanma sırasında oksidatif stresin yüksek düzeyde indüklenmesi kavramını, fizyolojik yaşlanma ile ilişkili kalp fonksiyon yetersizliği/komplikasyonu için potansiyel bir mekanizma olduğuna dair hipotezleri güçlendirmektedir (30). Bunlara ek olarak, bulgularımız, MAHO-C uygulamasının yaşlı fare kalplerinde mitokondriyi hedefleyerek ve böylece ROS üretimini kontrol ederek oksidatif stresi azalttığını kuvvetlice işaret etmektedir. Ayrıca, elde ettiğimiz bulgular fizyolojik yaşlanmada MAHO-C'nun mitokondriyi etkileyerek gerekli olan ATP üretiminin artmasını (ve ADP seviyesinin azalmasını) sağladığını kuvvetlice düşündürmektedir. Literatürde hipotezimizi ve bulgularımızı destekleyen çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu hususta yapılan çalışmalarda, oksidatif stresin yaşlanmanın fizyopatolojisinde rol oynadığına, kalp de dahil olmak üzere yaşlılığa bağlı çeşitli organların fonksiyonlarında değişime neden olduğunu ve uygun bir antioksidan takviyesinin kardiyovasküler fonksiyon bozukluğu için önemli bir koruyucu ajan olabileceğini göstermektedir (31). Her ne kadar deneysel çalışmalar yaşlanmaya bağlı kalpte yetersizlik/fonksiyon bozukluğunun oksidatif strestele ilişkili olduğunu bildiriyorlarsa da bu tür çalışmalarda antioksidanların yararlı

etkileri daima tartışmalı bir konu olmaktadır (31 - 34). Ayrıca, klinik çalışmalar kardiyovasküler hastalıkların birincil ve ikincil önlenmesinde/te-davisinde antioksidanların yararları konusunda tartışmalı görüşler mevcut değildir (32 - 34).

Bu çalışmada bir başka göze çarpan ve klinik uygulamalar için de önemli olabilecek bulgu, yaşlı farelerin standart beslenmelerinin yanı sıra MAHO-C uygulamasının, bradikardik ritim ve ventriküler aritmi olma olasılığını önleyebileceğinin gösterilmesidir. Bu bulgu, yaşlanma ile ilişkili hastalıkların önlenmesi veya etkisinin azaltılması için önemli olabilir, çünkü daha önce, yapılan çalışmalarda yaşlanma ile P-dalgası dağılımı arasındaki ilişki gösterilmiştir (35). Benzer şekilde, Luo ve ark. özellikle yaşlı memelilerde QRS-kompleksi ve/veya QT-aralığı süresinde uzamalar gibi benzer sonuçlar göstermiştir (36).

MAHO-C maddesinin kalpteki mekanizmalarını tam olarak göstermemiş olsa da anti-aging mekanizmaları üzerinde önemli bir etki olduğu görülmektedir (30). Manolol ve honokiol'nun kalp fonksiyonları üzerine olan sınırlı sayıdaki literatür çalışmaları, tek başına uygulanan honokiol takviyesinin antihipertansif etkisinin yanı sıra magnolol ve honokiol kompleksinin sıçanlarda iske mi ve reperfüzyon kaynaklı ventriküler aritmileri düzenlediği (37), doksorubisin uygulanan farelerde apoptoz oranını ve oksidatif stresi azalttığı (32), kalpte inflamatuvar yanıt larını da düzenlediği gösterilmiştir (19). Başka bir çalışmada, yenidoğan sıçan kalplerinden elde edilen kalp kası hücrelerinde primer kültürlerinin honokiol tedavisi ile hipertrofinin engellen-diği gösterilmiştir (38). Ayrıca in vitro çalışmalar MAHO-C'nun özellikle kalpte mitokondri lipid peroksidasyon seviyesinde iyileşmeler olduğunu göstermektedir (30 - 33). Yaşlanmada, artan anormal kalp ritimleri ve kalp yetmezliği, oksidanlardaki artışlar ve mitokondride fonksiyon bozukluğunun indüklenmesi ile ilişkilidir (39). Magnolol 'ün diğer etkilerinin yanı sıra antioksidan etkileri de dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik aktiviteleri de bildirilmiştir (40). Çalışmalar, sadece magnolol'ün değil, aynı zamanda honokiol 'ün sıçan kalbi mitokondrisinde lipit peroksidasyonunu inhibe etmede  $\alpha$ -tokoferolden 1000 kat daha güçlü olduğunu göstermiştir (41). Farelerden elde edilen endotel benzeri hücrelerde magnolol'ün ROS aracılı apoptozu

ve PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunu düzenlediği gösterilmiştir (42). Aynı zamanda magnolol'un antioksidan özelliği ile miyokard iskemisi/re-perfüzyonunda kalpte koruyucu etkileri bulunmaktadır (34). Bu çalışmada, yaşlı sıçanlara uygulanan MAHO-C, TOS'u azaltarak, TAS'ı ve bir antioksidan enzim olan arilesteraz aktivitesini artırarak güçlü bir antioksidan etki sağlamıştır. Buna paralel olarak, Zhao ve Liu, magnolol ve honokiol 'ün antioksidan yeteneklerini, radikal-leri temizlemedeki eylemlerini karşılaştırarak belgelemişlerdir (20). Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, polifenol bakımından zengin bir diyetin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyabileceğini düşündürmektedir. Magnolol ve honokiol'un antioksidan etkileri peroksil radikalleri ile reaksiyon sonucu oluşmaktadır (43). Bu nedenle, bu iki polifenolik bileşiğin, kardiyovasküler modüle edici etkilerini karmaşık bir sinyal transdüksiyon kaskad reaksiyonu yoluyla sergilediklerine dair artan sayıda kanıt vardır. Yuan ve ark. magnolol ve honokiol'un antioksidan özelliğinin molekül içi ve moleküller arası etkileşimler sonucu süperoksit radikallerin engellemesi ile meydana geldiğini saptadılar (43). Ayrıca bu çalışma ile, literatürde ilk kez MAHO-C'nun yaşlı kalpte mitokondri ilişkili SDH aktivitesi ve ATP/ADP oranında iyileşmelere neden olduğu gösterilmiştir. Mitokondriyal bir enzim olan SDH'nin, Krebs döngüsü ile elektron taşıma zinciri arasındaki bir bağlantı yoluyla ATP üretiminde önemli bir role sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle, yüksek seviyede ROS üretiminden önemli derecede sorumludur. ROS üretimini kontrol eden bir ajan ile (örneğin MAHO-C gibi bir ajan ile), kalbin korunmasına katkısı olduğu görülmektedir (44). Fizyolojik yaşlanma, sol ventrikülün yapısında bozulmaya ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğundan, bir magnolol kabuğu kompleksinin yaşlanmaya bağlı bu bozulmaların iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır. Yukarıda bahsedilen bilgilere ilaveten, magnolol kabuğunun antioksidan özelliğinin mitokondriyal fonksiyon bozukluğu üzerinde modülatör etkisi olduğunu gösteren çalışmalar vardır (38).

Çalışma bulgularımız antioksidan takviyesinin etkinliğinin sadece plazma biyokimyasını iyileştirebileceğini ve/veya değiştirebileceğini değil, aynı zamanda bazal endojen antioksidan

savunmalarına bağlı olarak oksidatif metabolizmadaki artışlara karşı organ hedefleme yararları sağlayabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada ilk kez manolya kabuğu ekstraktı olan MAHO-C takviyesinin yaşlı sıçan kalp fonksiyonel değişiklikleriyle ilişkili fizyolojik yaşlanmada kalpte gelişen değişim/bozulma karşı koruyucu/iyileştirici etkisi gösterilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen mevcut verilerimiz, MAHO-C takviyesinin yaşlı bireylerde yaşlanmaya bağlı kalp fonksiyon bozukluğunu mitokondrileri etkileyerek yeni bir düzenleyici/koruyucu ajan olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Bu çalışma Lokman Hekim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında 202AP404-2022 nolu proje ile desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: role of chronic inflammation. *Prev Med.* 2012;54: 29-37.
2. Lakatta EG, Sollott SJ, Pepe S, The old heart: operating on the edge. *Novartis Found Symp.* 2001;235: 172-96.
3. Dillin A, Gottschling DE, Nystrom T. The good and the bad of being connected: the integrons of aging. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;(26):107-12.
4. Rodgers JL, Jones J, Bolleddu SI, et al. Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging. *J Cardiovasc Dev Dis.* 2019;6(2):1-19.
5. Lazzarini E, Lodrini AM, Arici M, et al. Stress-induced premature senescence is associated with a prolonged QT interval and recapitulates features of cardiac aging. *The-ranostics.* 2022;12(11):5237-57.
6. Lesnefsky EJ, Chen Q, Hoppel CL, Mitochondrial metabolism in aging heart. *Circulation Research.* 2016;118(10):1593-611.
7. Chason KD, Jaspers I, Parker J, et al. Age-Associated Changes in the Respiratory Epithelial Response to Influenza Infection. *Journals of Gerontology. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences.* 2018;73(12):1643-50.
8. Ormazabal V, Nair S, Elfeky O, et al. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology.* 2018;17(1):1-14.
9. Boudina S. Cardiac aging and insulin resistance: could insulin/insulin-like growth factor (IGF) signaling be used as a therapeutic target? *Current Pharmaceutical Design.* 2013;19(32):5684-94.
10. Olgar Y, Billur D, Tuncay E, Turan B. MitoTEMPO provides an antiarrhythmic effect in aged-rats through attenuation of mitochondrial reactive oxygen species. *Exp Gerontol.* 2020;136:110961.
11. Izzo NJ, Yuede CM, LaBarbera KM, et al. Preclinical and clinical biomarker studies of CT1812: A novel approach to Alzheimer's disease modification. *Alzheimers Dement.* 2021;17(8):1365-82.
12. Conti V, Izzo V, Corbi G, et al. Antioxidant supplementation in the treatment of aging-associated diseases. *Frontiers in pharmacology.* 2016;7:24.
13. Howlett SE. Age-associated changes in excitation-contraction coupling are more prominent in ventricular myocytes from male rats than in myocytes from female rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(2):659-70.
14. Thomàs-Moyà E, Gianotti M, Proenza AM, Lladó I. The age-related paraoxonase 1 response is altered by long-term caloric restriction in male and female rats. *J Lipid Res.* 2006;47(9):2042-8.
15. Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, et al. Antioxidants in cardiovascular therapy: panacea or false hope?. *Front Cardiovasc Med.* 2015;2:29-50.
16. Duan J, Xiao J, Chen Y, et al. Inhibition of magnolol and honokiol on cytochrome P450 enzymes in rat and human liver microsomes. *Chinese Herbal Medicines.* 2015;7(2):167-72.
17. Jiang Y, Zhao Q, Li L, et al. Effect of Traditional Chinese Medicine on the Cardiovascular Diseases. *Front Pharmacol.* 2022;13:806300.
18. Xie Z, Zhao J, Wang H, et al. Magnolol alleviates Alzheimer's disease-like pathology in transgenic *C. elegans* by promoting microglia phagocytosis and the degradation of beta-amyloid through activation of PPAR- $\gamma$ . *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2020; 124:109886.
19. Zhang GS, Wang RJ, Zhang HN, et al. Effects of chronic treatment with honokiol in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(3): 427-31.
20. Zhao C, Liu ZQ. Comparison of antioxidant abilities of magnolol and honokiol to scavenge radicals and to protect DNA. *Biochimie.* 2011;93(10):1755-60.
21. Oh S, Gadde UD, Bravo D, et al. Growth-promoting and antioxidant effects of magnolia bark extract in chickens uninfected or co-infected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria maxima* as an experimental model of necrotic enteritis. *Current Developments in Nutrition.* 2018;2(4):9.
22. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37(2):112-9.
23. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103-11.
24. Cakmak A, Zeyrek D, Atas A, Erel O. Paraoxonase activity in athletic adolescents. *Pediatr Exerc Sci.* 2010;22(1):93-104.

- 25.** Degirmenci S, Olgar Y, Durak A, Tuncay E, Turan B. Cytosolic increased labile Zn<sup>2+</sup> contributes to arrhythmogenic action potentials in left ventricular cardiomyocytes through protein thiol oxidation and cellular ATP depletion. *J Trace Elem Med Biol.* 2018; 48:202-12.
- 26.** Merentie M, Lipponen JA, Hedman M, et al. Mouse ECG findings in aging, with conduction system affecting drugs and in cardiac pathologies: Development and validation of ECG analysis algorithm in mice. *Physiol Rep.* 2015;3(12):e12639.
- 27.** Xing S, Tsaih SW, Yuan R, Svenson KL, Jorgenson LM, et al. Genetic influence on electrocardiogram time intervals and heart rate in aging mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(6):1907-13.
- 28.** Herrmann S, Fabritz L, Layh B, Kirchhof P, Ludwig A. Insights into sick sinus syndrome from an inducible mouse model. *Cardiovasc Res.* 2011;90(1):38-48.
- 29.** Liu Y, Jansen HJ, Krishnaswamy PS, Bogachev O, Rose RA. Impaired regulation of heart rate and sinoatrial node function by the parasympathetic nervous system in type 2 diabetic mice. *Sci Rep.* 2021;14;11(1):12465.
- 30.** Billur D, Aktay I, Bayram P, Bitirim CV, Turan B, Morphological and functional analysis of cardiac ameliorations in elderly rats supplemented with a magnolol extract complex. *Int. J. Morphol.* 2023;41(3):915-25.
- 31.** Bou-Teen D, Kaludercic N, Weissman D, et al. Mitochondrial ROS and mitochondria-targeted antioxidants in the aged heart. *Free Radical Biology and Medicine.* 2021;167: 109-24.
- 32.** Huang L, Zhang K, Guo, Y, et al. Honokiol protects against doxorubicin cardiotoxicity via improving mitochondrial function in mouse hearts. *Scientific Reports.* 2017;7(1): 1-12.
- 33.** Lo YC, Che-Ming T, Chieh-Fu C, et al. Magnolol and honokiol isolated from *Magnolia officinalis* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology.* 1994;47(3):549-53.
- 34.** Leopold JA, Antioxidants and coronary artery disease: from pathophysiology to preventive therapy. *Coronary Artery Disease.* 2015;26(2):176.
- 35.** Magnani JW, Gorodeski EZ, Johnson VM, et al. P wave duration is associated with cardiovascular and all-cause mortality outcomes: the National Health and Nutrition Examination Survey. *Heart Rhythm.* 2011;8(1):93-100.
- 36.** Luo X, Yu W, Liu Z, et al. Ageing Increases Cardiac Electrical Remodelling in Rats and Mice via NOX4/ROS/CaM-KII-Mediated Calcium Signalling. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;8538296.
- 37.** Lee YM, Hsiao G, Chen HR, et al. Magnolol reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via neutrophil inhibition in rats. *European Journal of Pharmacology.* 2011;422(1-3):159-67.
- 38.** Pillai VB, Samant S, Sundaresan NR, et al. Honokiol blocks and reverses cardiac hypertrophy in mice by activating mitochondrial Sirt3. *Nature Communications.* 2015;6(1): 1-16.
- 39.** Yan M, Sun S, Xu K, et al. Cardiac aging: from basic research to therapeutics. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2021;1:1-13.
- 40.** Tsai YC, Cheng PY, Kung CW, et al. Beneficial effects of magnolol in a rodent model of endotoxin shock. *European Journal of Pharmacology.* 2010;641(1):67-73.
- 41.** Hong TD, Ellis RH, A protocol to determine seed storage behaviour (No. 1). *Bioversity International.* 1996;1-62.
- 42.** Kim GD, Oh J, Park HJ, et al. Magnolol inhibits angiogenesis by regulating ROS-mediated apoptosis and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in mES/EB-derived endothelial-like cells. *International Journal of Oncology.* 2013;43(2): 600-10.
- 43.** Yuan Y, Zhou X, Wang Y, et al. Cardiovascular modulating effects of Magnolol and Honokiol, two polyphenolic compounds from traditional Chinese medicine-*Magnolia officinalis*. *Current Drug Targets.* 2020;21(6): 559-72.
- 44.** Du K, Wang Y, Tang K, et al. A study on the relationship between succinate dehydrogenase and mitoKATPC in the mechanism of ischemic postconditioning protecting against MIRI under CPB in adult rats. *Research Square.* 2022;(8):1-21.