

# Magnolia Officinalis Ekstraktının Kardiyak Yaşlanmada Gözlenen Mitokondri Fonksiyon Bozukluğu Üzerindeki Düzenleyici Etkileri

## The Regulatory Effects of Magnolia Officinalis Extract on Aging-induced Mitochondrial Dysfunction in Cardiomyocytes

© Ceylan Verda Bitirim

Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Ankara, Türkiye

### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada Magnolia Officinalis'ten elde edilen bitkisel bir materyal olan ve anti-enflamasyon, antioksidatif stres ve antiapoptozda önemli rollere sahip olduğu ileri sürülen magnolia ekstraktının (ME), kardiyomiyositlerde yaşlanmaya bağlı artan reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve mitokondri membran potansiyelinin (MMP) depolarize olması ile koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, yaşlı kardiyomiyositlerde bu maddenin apoptoz ve endoplazmik retikulum (ER) stresi üzerindeki baskılayıcı etkisinin hangi biyobelirteçler üzerinden olduğunun moleküler düzeyde incelenmesi hedeflenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada sıçan sol ventrikül hücre hattı H9c2'ler kullanılarak *in vitro* yaşlanma modeli oluşturulmuştur. D-galaktoz (D-Gal; 50 mg/mL) ile 48-saat muamele edilen H9c2 hücreleri, 18 saat boyunca 5 µM ME ile inkübe edilmiş ve yaşlı kardiyomiyositlerdeki ROS üretimi ve MMP depolarizasyonuna etkileri incelenmiştir. ROS ve MMP ölçümleri floresans boyalar olan dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) ve carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP) kullanılarak konfokal mikroskopunda gerçekleştirilmiştir. ER-stresi belirteçleri Calregulin ve glucose-regulated protein 78 ve apoptoz belirteci olarak ise dengeleyici nükleosit taşıyıcı 1 ifadesindeki ME muamelesi sonrasındaki değişim qRT-PCR ölçümleri ile analiz edilmiştir.

**Bulgular:** Yaşlanma modeli oluşturulmuş kardiyomiyositlerin, ME ile inkübasyonu yaşlanmaya bağlı artan ROS üretiminin belirgin şekilde baskılanmasına, depolarize olan MMP'nin normal değerlere dönmesine neden olmuştur. Ayrıca, mitokondri fonksiyon bozukluğu ile gelişen ER-stres ve apoptozun ME muamelesi ile baskılandığı ve bu etkinin altında yatan nedenler arasında oksidatif stres ve apoptoz belirteç genlerinin ifadelerinin normal değerlere doğru iyileştiği gözlenmiştir.

**Sonuç:** Çalışma bulguları, kalp koruyucu etkileri bilinen magnolia officinalis ekstraktının kalp yaşlanması ile kontrolsüz olarak gelişen mitokondri fonksiyon bozukluğunu fonksiyonel ve moleküler düzeyde düzenleyerek yaşlanmaya bağlı artan kalp yetmezliğinde yeni bir tedavi yaklaşımı olarak uygulanabileceğini işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Yaşlanma, Magnolia Officinalis, Kardiyomiyosit, ROS, Mitokondri, ER Stres, Apoptozis

### Abstract

**Objectives:** In this study, it is aimed to examine the protective effect of magnolia extract (ME), a herbal material obtained from Magnolia Officinalis, which is claimed to have an important role in anti-inflammation, antioxidative stress and antiapoptosis, with increased reactive oxygen species (ROS) production due to aging and depolarized mitochondrial membrane potential (MMP) in cardiomyocytes and its suppressive effect on apoptosis and endoplasmic reticulum (ER) stress at the molecular level.

**Materials and Methods:** In the study, an *in vitro* aging model was created using rat left ventricular cell line H9c2. H9c2 cells treated with D-galactose (D-Gal; 50 mg/mL) for 48 hours were incubated with 5 µM ME for 24 hours and their effects on ROS production and MMP depolarization in aged cardiomyocytes were examined. ROS and MMP measurements were performed under confocal microscopy using fluorescent dyes dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP). With the ER- stress markers Calregulin and glucose-regulated protein 78, qRT-PCR measurements of the change in expression of the apoptosis marker equilibrative nucleoside transporter 1 after ME treatment were analyzed.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Ceylan Verda Bitirim

Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 535 612 67 96 E-posta: bitirim@ankara.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-7979-0679

Geliş Tarihi/Received: 26.10.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 24.12.2021

©Telif Hakkı 2022 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



**Results:** Incubation of aging-modeled cardiomyocytes with ME provides significant suppression of aging-related ROS production and regulation of depolarized MMP. In addition, we observed that ER-stress and apoptosis developed by mitochondrial dysfunction were suppressed by ME treatment, by examining the expressions of stress and apoptosis marker genes.

**Conclusion:** Our findings show that Magnolia officinalis extract, known for its cardioprotective effects, can be applied as a new treatment approach in aging-related heart failure by regulating mitochondrion dysfunction that develops uncontrollably with cardiac aging at the functional and molecular level.

**Key Words:** Aging, Magnolia Officinalis, Cardiomyocytes, ROS, Mitochondria, ER Stress, Apoptosis

## Giriş

Kardiyovasküler hastalık (KVH) prevalansı, ilerleyen yaşla birlikte çarpıcı biçimde artmakta ve bu artış büyük ölçüde hipertansiyon, diyabet, fiziksel hastalık gibi kardiyovasküler risk faktörlerine uzun süreli maruz kalmaya bağlanmaktadır. Yaşlanma sırasında kardiyomiyositlerde yapısal ve işlevsel değişikliklerin gelişmesi olarak tanımlanan kalp yaşlanması, kalbi çeşitli stres faktörlerine karşı daha savunmasız hale getirmekte ve KVH gelişimini desteklemektedir (1). Kalpte yaşlanmaya dahil olan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olsa da, yaşın ilerlemesi ile birlikte artan makromoleküler oksidatif hasarın ana faktör olduğu düşünülmektedir (2). Reaktif oksijen türleri (ROS), çeşitli enzimatik reaksiyonlar tarafından mitokondri tarafından üretilmektedir. Deneysel bulgular, yaşlanma süreci boyunca mitokondri fonksiyonunun azaldığını ve bunun ROS oluşumunun artması, serbest radikallerin neden olduğu hasarın artması ve daha fazla (pozitif geri-besleme) mitokondri fonksiyonunun bozulma ile sonuçlandığını göstermektedir. Aşırı ROS üretimi ve/veya kusurlu oksidan süpürme, yaşlanma sürecinde ve aynı zamanda KVH da dahil olmak üzere çeşitli kronik dejeneratif hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır (3).

Yaşlı kemirgenlerin miyokardında mitokondri proteinleri, lipidleri ve nükleik asitlerinde yüksek seviyelerde oksidatif hasar tespit edilmiştir (4). Bu durum mtDNA'sında mutasyonların birikmesine yol açabilmektedir. mtDNA mutasyonları elektron transport sistemi bileşenlerinin hatalı sentezine yol açarak adenosin trifosfat (ATP) üretiminin azalmasına ve daha fazla ROS oluşumuna yol açabilmektedir (5). Mitokondri fonksiyon bozukluğunun kalp yetmezliği, sol ventrikül hipertrofisi ve diyabetik kardiyomiyopati gibi yaşa bağlı dejeneratif hastalıkların patogeneğinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (4,5).

ROS üretimiyle birlikte, ATP düzeyinde önemli seviyede azalma ve mitokondri membran potansiyelinde depolarizasyon gerçekleşmektedir. Mitokondri fonksiyon bozukluğunun apoptoz indüksiyonuna katıldığı gösterilmiş ve hatta apoptotik yolun merkezinde olduğu öne sürülmüştür (5,6). Önceki çalışmalarda, mitokondride geçirgenlik geçiş gözeneklerinin açılmasının, transmembran potansiyelinin ( $\Delta\psi_m$ ) depolarizasyonunu, apoptoz ile ilgili faktörlerin salınarak sitozole geçtiği ve oksidatif fosforilasyon kaybını indüklediği gösterilmiştir (6). Özetle, artan ROS üretimine

bağlı olarak hücrelerde otofaji, apoptoz, kronik inflamasyon ve mitokondri-DNA instabilitesi mitokondri fonksiyon bozukluğu ile birlikte kalpte yaşlanma ile ilişkili patofizyolojik olaylardır (7,8). İlerleyen yaşla birlikte ROS artışına neden olduğu mutasyonların birikmesi ve oksidatif hasar nedeniyle mitokondri DNA hacmi, bütünlüğü ve işlevselliği azalmaktadır (9). Hasarlı mitokondri, çünkü, sadece daha az ATP üretmekle kalmaz, aynı zamanda artan miktarlarda ROS üretir ve apoptozu tetiklemek için daha büyük bir eğilim gösterir (10). Kardiyomiyosit mitokondri fonksiyon bozukluğu ve mitokondri otofajisinin optimal düzenlenmesi özellikle yaşlanmada sık görülen belirli kalp hastalıklarında rol oynadığı için kritik öneme sahiptir (1).

Magnolia officinalis bitkisinden izole edilen aktif bir bileşen olan Magnolol'un 1994 yılından beri kardiyovasküler koruyucu olduğu bilinmektedir (11). Manolol ve honokiol içeren oldukça aromatik ve polifenolik bileşenler olan manolya kabuğundan manololün saflaştırılarak hazırlanan sentetik manolol/honokiol, analogları ve türevleri antioksidan, anti-depresan, anti-alerjik, anti-kanser ve anti-mikrobiyal ajan olarak karakterize edilmiştir ve klinikte kullanılmaktadır (11,12). Düşük ve orta dozda Magnolol, kalbi iskemik/reperfüzyon hasarından koruma, aterosklerotik değişikliği azaltma, endotel hücrelerini apoptozu karşı koruma ve nötrofil-endotelial yapışmayı engelleme yeteneğine sahiptir (12). Bu çalışmalarda, magnololun, orta konsantrasyonda vasküler düz kas hücrelerinde apoptozu indükleyebildiği ve orta/yüksek konsantrasyonlarda proliferasyonu inhibe edebildiği ileri sürülmüştür. Tüm bu etkiler, magnololün yüksek riskli hastalarda KVH'leri önlemek için potansiyel bir ilaç olarak uygulanabilirliğini düşündürmektedir (13). Bir dizi hayvan çalışmasında, Hong ve ark. (14), koroner arter ligasyonundan önce 6-10 mg/kg'nin üzerindeki dozlarda intravenöz magnolol enjeksiyonunun hem iskemi hem de reperfüzyona bağlı ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyonu başarılı bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Ayrıca, kalp fibroblastlarından elde edilen *in vitro* sonuçlar, magnololün enfarktüs sonrası rejeneratif evre sırasında kardiyak fibrotik değişikliği azaltma potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir (15). Diğer yandan, ME'nin farelerdeki oral tümörde ROS üretimini baskılayarak kanser hücrelerinin büyümesinin ve çoğalmasının inhibe ettiği de gözlenmiştir (16). Ancak ME'nin kalp yaşlanmasına bağlı fonksiyonel ve

moleküler mekanizmalar üzerinedeki etkisi bilinmemektedir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda bir antioksidan ve kardiyoprotektif ajan olan magnoliya ekstraktın *in vitro* koşullarda yaşlı sıçan ventrikül hücresi fonksiyonu ile ilişkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Çalışma sonuçları, magnoliya ekstrakt muamelesinin yaşlı kardiyomiyositlerdeki aşırı ROS üretimi ve buna paralel olarak bozulan mitokondri membran potansiyelini düzelterek, mitokondri fonksiyon bozuklukları ve yetersizliklerini geri döndürebildiğini, yaşlanma ile kardiyomiyositlerde artan apoptoz ve endoplazmik retikulum (ER) stresini baskılayabildiğini göstermiştir.

## Gereç ve Yöntem

### Hücre Kültürü ile İşlemler

Çalışmada kullanılan sıçan sol ventrikül hücre hattı H9c2, %1 penisilin-streptomisin ve %10 fetal sıçır serumu içeren Dulbecco tarafından modifiye edilen Eagle besiyeri-düşük-glukoz besiyeri içerisinde büyütülmüştür. Yaşlanma modeli, daha H9c2 hücrelerinde 50 mg/mL D-Gal ile 48 saat boyunca inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Bunu takiben hücreler 5 µM magnolia ekstraktı (ME) ile 18 saat muamele edilmiştir (17).

### Magnolia Ekstraktının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Yüksek dozlarda toksik etkileri olduğu bilinen ME'nin, deneylerde kullanılacak dozunu kararlaştırmak amacı ile genç kontrol ve yaşlı H9c2'lerin canlılığı üzerine etkileri hücre çoğalma testi (MTT) ile karar verildi. 96 kuyucuklu hücre tabaklarına 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen kontrol ve yaşlı H9c2 hücreleri literatürde belirtilen doz olan 5 µM (17) ve 10 µM ME ile 18 saat boyunca inkübe edildi. 18 saat sonunda MTT testi (Merck), üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. 630 nm dalga boyunca okuma alındıktan sonra değerler kontrol (ME ile inkübe edilmemiş) grubu değerlerine oranlanarak normalize edildi.

### H9c2 Hücrelerinde ROS Seviyesinin Ölçülmesi

H9c2 hücrelerinde ROS ölçümü, ROS oluşumuna spesifik floresans boya (DCDFA 10 µM) kullanılarak konfokal mikroskopunda (Leica TCS SP5), floresans şiddetinde değişim olarak görüntülenmiştir (10). Kontrol grubu hücreleri, yaşlı (D-Gal) hücreler ve bunların 48 saat boyunca 5 µM magnolia ekstraktı ile muamele edilmiş grupları (Kontrol + ME ve D-Gal + ME) ROS oluşumuna spesifik floresans boya olan DCFDA ile yüklenerek bazal floresans ölçümleri (F0) alınmıştır. Yüksek doz (100 µM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile hücrelerde maksimum floresans (F) ölçümü yapılmıştır. Her hücre için floresans yoğunluğu değişiklikleri  $\Delta F/F_0$  ile hesaplanmıştır ( $\Delta F = F - F_0$ ). ROS oluşumu için eksitasyon ve emisyon dalga boyları Eex: 490 nm ve Eem: 530 nm kullanılmıştır.

### Mitokondri Membran Potansiyeli (MMP) Ölçümü

Mitokondriyal membran potansiyeli, önceki çalışmalarda tarif edildiği gibi floresans bazlı olarak ölçüldü (10). Kontrol, yaşlı ve ME ile inkübe edilen H9c2 hücreleri 3 µM JC-1 floresans boya ile 45 dakika oda sıcaklığında boyandı. Hücrelerin ışımaya değerleri 585/535 oranına göre değerlendirildi. Bazal ölçüm alındıktan sonra (F0) MMP ölçümlerini kalibre etmek için 5 µM FCCP [karbonil siyanür 4-(triflorometoksi)feylhidrazon] kullanıldı ve tekrar ölçüm alındı (F). Floresans sinyali şiddet değişiminden arka plan sinyali çıkarıldıktan sonra  $\Delta\Psi_m = F - F_0 / F_0$  (F0 = bazal sinyal, F=maksimum floresans değeri) formülü kullanılarak membran potansiyel değişimleri hesaplandı. Görüntülemeler Leica TCS SP5 konfokal mikroskopu ile gerçekleştirilmiştir.

### H9c2 hücrelerinden mRNA izolasyonu ve qRT-PCR ile mRNA ifadesinin ölçülmesi

Hücrelerden total RNA izolasyonu trizol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonunu takiben cDNA sentez kiti (EntiLink, ELK Biotechnology) ile reverse transkriptaz enzimi yardımı ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon için *Beta-actin* geninin ifadesi kullanılmıştır. Sonuçlar bağıl CT metodu (2<sup>-deltaCt</sup>) ile analiz edilmiştir.

## BULGULAR

### Magnolia Ekstraktının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

Deneylerde H9c2 hücrelerinin muamelesinde kullanılacak ME konsantrasyonuna karar vermek için MTT (hücre çoğalma) testi uygulandı. Literatürde H9c2 hücreleri üzerine toksik etkisi gözlenmemiş en yüksek doz olan 5-µM (17) ile 10-µM ME çalışmamızda test edildi. Sonuçlarımıza göre özellikle yaşlı (D-Gal) grupta 10-µM ME'nin 5-µM'ye oranla düşüş göstermesi sebebi ile çalışmamızda, literatüre de dayanarak, 5-µM konsantrasyonda ME kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 1).

### Magnolia Ekstraktı Yaşlı Kardiyomiyositlerde Artan Hücre İçi ROS Üretimi Baskılar

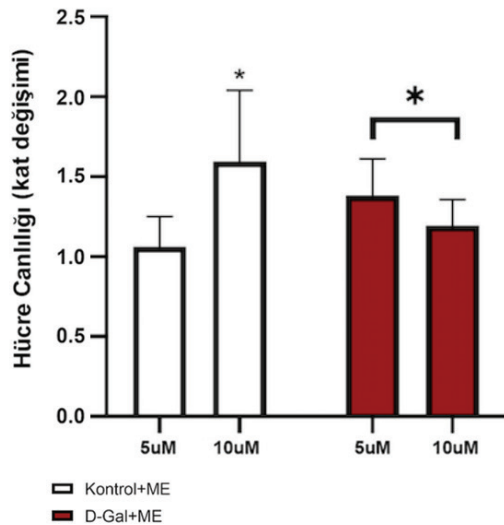
Yaşlı sıçan kardiyomiyositler ile yapılan önceki çalışmamızda yaşlı hücrelerdeki ROS artışının genç kontrole hücrelerine göre yaklaşık 1,4 kat olduğu gözlenmiştir (17). Bu çalışmada, D-Gal muamelesi ile yaşlandırılmış H9c2 hücre grubundaki (D-Gal) ROS üretimi, magnoliya ekstrakt ile inkübe edilen yaşlı grup (D-Gal + ME) ile konfokal mikroskop kullanılarak karşılaştırılmıştır. Önceki çalışmalar ile uyumlu olarak, yaşlı kardiyomiyositlerde bazal ROS miktarının kontrole göre 2 kattan fazla artış gösterdiği, 18 saat ME inkübasyonunun bu yaşlı kardiyomiyositlerdeki ROS üretimini belirgin şekilde baskıladığı gözlenmiştir (Şekil 2A). Bu sonuç, ME'nin aşırı ROS üretimini baskılayarak yaşlı kalpte koruyucu etkisi olabileceği hipotezini desteklemektedir.

## Magnolia Ekstraktı Yaşlı Kardiyomiyosit Mitokondri Fonksiyon Bozukluğunu MMP Depolarizasyonu Etkileyerek Düzenler

Mitokondri ROS üretiminin, mitokondri membran potansiyeli ( $\Delta\psi$ ) seviyesi ile paralel olarak ilerlediği bilinmektedir (18). Çalışmamızda ME'nin kalp yaşlanmasındaki ROS homeostazındaki rolüne ek olarak, yaşlanmaya bağlı değişen MMP üzerinde önemli bir düzenleyici etkisi olduğunu da gözlenmiştir. Kontrol grubu kardiyomiyositlerde ME muamelesi MMP üzerinde anlamlı bir değişime neden olmaz iken, yaşlı hücrelerde önemli ölçüde depolarize olan MMP'yi, ME ile inkübasyon sonrası düzeltilmekte ve kontrol grubu seviyesine yaklaşılmaktadır (Şekil 2B).

## Magnolia Ekstrakt Muamelesi Yaşlı Kardiyomiyositlerde Artan ER-Stres ve Apoptoz Baskılar

ER ve mitokondri, protein homeostazının düzenlenmesinde ve normal hücre fonksiyonunun korunmasında kritik rol oynamaktadır. Önceki yıllarda, ER ve mitokondri arasında yoğun bir şekilde etkileşime olduğu (cross-talk) ve etkileşimin sağlıklı kalp fonksiyonu için bir ön koşul olduğu gözlenmiştir. Fiziksel olarak, mitokondri ve ER yakın temas halindedir ve bu durum ER tarafından salınan  $Ca^{2+}$ 'nin mitokondri tarafından alınımını kolaylaştırır ve mitokondri tarafından ATP üretimine katkıda bulunur (19). Yaşlanmaya bağlı olarak kardiyomiyositlerde artan ER-stres belirteçleri olan Calregulin (Şekil 3A) ve GRP78'in (Şekil 3B) mRNA ifadeleri, ME ile inkübasyon sonrasında anlamlı olarak



**Şekil 1:** MTT ile hücre canlılığı testi A) Kontrol grubu H9c2 ve 50 mg/mL D-Gal ile 48 saat boyunca inkübe edilen H9c2'ler ile oluşturulmuş yaşlı grubu 5 µM ve 10 µM ME ile 18 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde canlılık, 18 saat sonunda MTT testi ile analiz edilmiştir. Yaşlı hücrelerde 10 µM ME'nin canlılıkta neden olduğu düşüş nedeni ile deneylerde 5 µM konsantrasyonda ME kullanılmasına karar verilmiştir.

Veriler ortalama ( $\pm$ SD) olarak verilmiştir. n=3 ve istatistiksel anlamlılık \*p<0,05, \*\*p<0,01

SD: Standart sapma, ME: Manolya ekstraktı, MTT: Hücre çoğalma testi

azalmaktadır. ER ve mitokondri arasındaki etkileşimler fizyolojik koşullar altında apoptozu düzenlemektedir. ME muamelesi yaşlı H9c2'lerde artan apoptoz için önemli bir belirteç olan Dengeleyici nükleosit taşıyıcı 1'in ifadesini de baskılamaktadır (Şekil 3C).

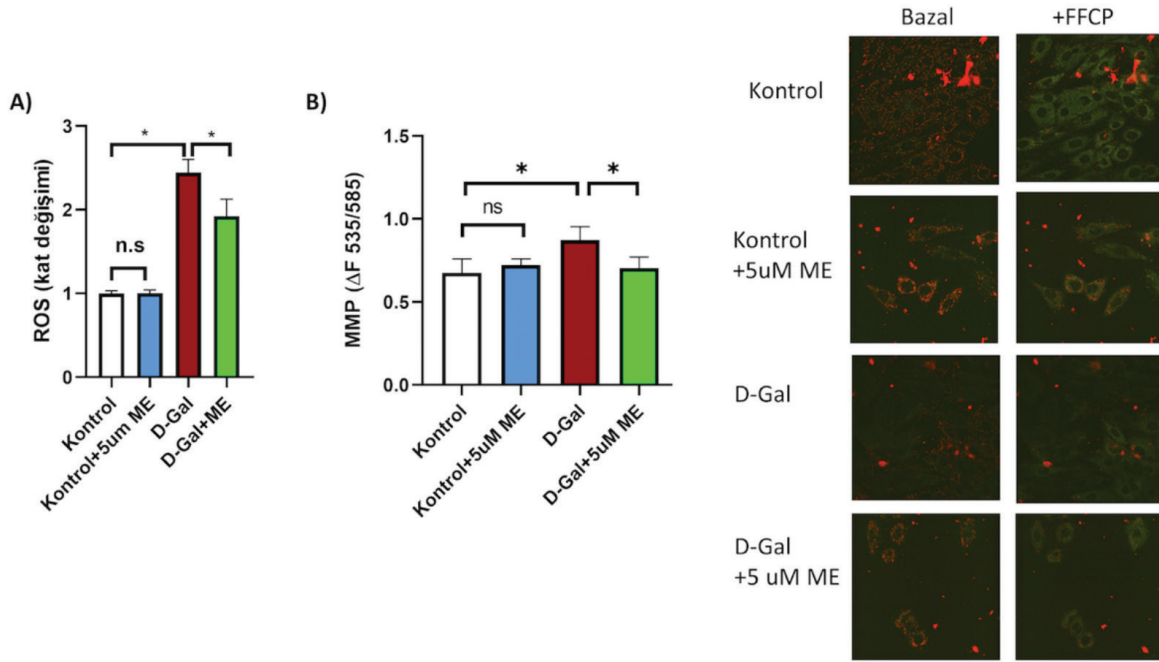
## Tartışma

Metabolik olarak, kalp oldukça aktiftir ve mitokondrileri önemli bir oksidatif stres yükü ile karşı karşıyadır (18). Ayrıca, kardiyomiyositler, birkaç on yıllık bir ömre sahip, terminal olarak farklılaşmış, post-mitotik hücrelerdir. Bu nedenle, sağlıklı bir mitokondri havuzunun korunması ve hasarlı ve potansiyel olarak zararlı organellerin etkin bir şekilde uzaklaştırılması, kardiyomiyosit homeostazının korunması için hayati önem taşır (1). Daha önce tartışıldığı gibi, hayvan modellerinden elde edilen kanıtlar, mitokondriyal disfonksiyonun yaşlılıkta oldukça yaygın olan kalp yetmezliği, sol ventrikül hipertrofisi ve diyabetik kardiyomiyopati gibi bir dizi kalp hastalığının patogeneğinde de rol oynadığını göstermiştir (5,20). Gerçekten de, yaşlı kemirgenlerden miyokardın ultrastrüktürel analizi, mitokondrilerde şişme, krista kaybı ve matris düzensizliği ile karakterize edilen genişlemiş mitokondri varlığını göstermiştir (21). Biyokimyasal olarak, bu yaşlanmış ve biyoenerjetik olarak verimsiz mitokondriler azaltılmış ATP üretimi ve artan ROS üretimi sergiler (22).

Son 20 yılda, magnololün bir antioksidan ve anti-tümorojenik etkilerinin yanı sıra kardiyovasküler sistemin farklı hücrelerinde farklı fonksiyonlara sahip olduğu bulunmuştur. Bu etkiler doza bağlıdır ve magnolol tarafından düzenlenen farklı moleküler mekanizmaların sonucudur. Koroner arter ligasyonundan önce 6-10 mg/kg'nin üzerindeki dozlarda intravenöz magnolol enjeksiyonunun hem iskemi hem de reperfüzyona bağlı ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyonu başarılı bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Beş mg/kg magnolol ve üzeri, enfarktüs boyutunu önemli ölçüde azaltmıştır (16). Tüm bu bulgular, magnololün yaşlanmaya bağlı gelişen kardiyak yaşlanmanın beraberinde getirdiği KVH hastalıklarda koruyucu ve tedavi edici bir, alternatif ve etkili bir ajan olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda *in vitro* yaşlanma modeli olarak kullandığımız H9c2 kardiyomiyosit hücre hattında ME'nin öncelikle ROS ve MMP üzerindeki etkilerini inceledik. Sıçan kardiyak fibroblastlarında ERK1/2 sinyal yolu aktivasyonunun magnolol (10 µM) tarafından inhibe edildiği ve ROS üretimini baskılandığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (22). Bulgularımız, bu sonuç ile uyumlu olarak yaşlı kardiyomiyositlerde 5 µM ME muamelesinin mitokondriyal disfonksiyonu tersine düzenleyerek artan ROS üretimi ve MMP üzerinde olumlu etkilerini gözlemledik.

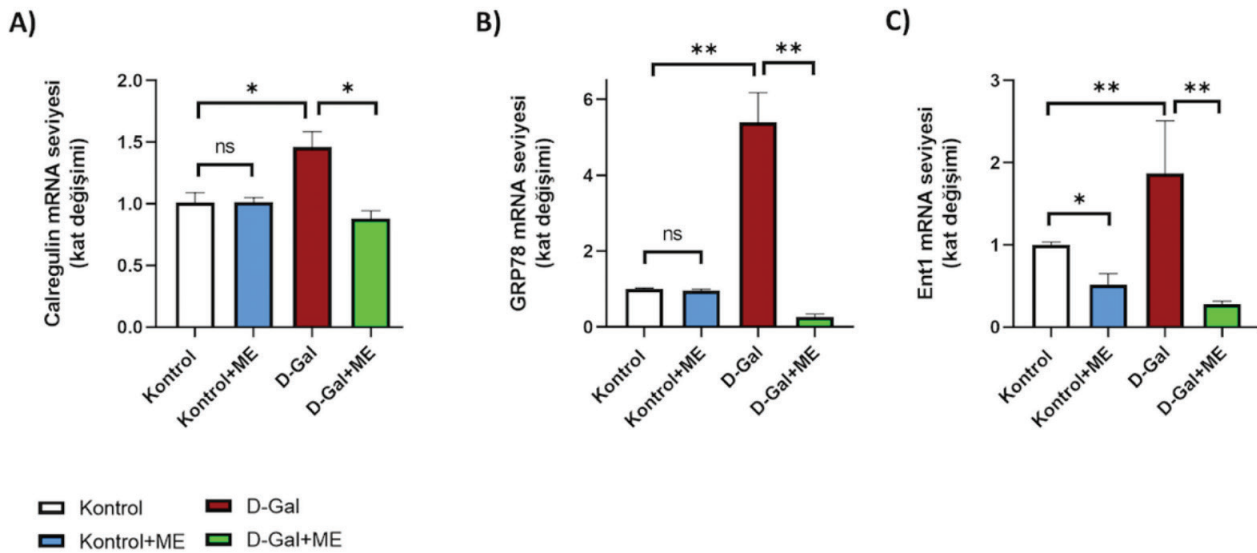
Mitokondriyal fonksiyon üzerine etkisi dışında, intraperitoneal enjeksiyon yoluyla 10 mg/kg'den yüksek





**Şekil 2:** ME ile inkübe edilmiş H9c2'lerde yaşlanmaya bağlı artan ROS üretimi ve mitokondri membran potansiyelinin (MMP) ölçülmesi. A) Konfokal mikroskopi kullanılarak hücre içi ROS seviyesi Floresans şiddet seviyelerindeki değişimler olarak kantite edilmiştir. Kontrol ve yaşlı (D-gal) grubu 18 saat 5 µM ME ile inkübe edilmiş, bunu takiben konfokal görüntülemesi için ROS göstergesi klorometil-2',7'-diklorodihidroflorosein diasetat (DCFDA) ile 1 saat muameleye maruz bırakılmıştır. ME inkübasyonunun yaşlı (D-Gal) kardiyomiyositlerde ROS üretimini anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Veriler ortalama (± SS) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=20-30 hücredir. İstatistiksel anlamlılık \*p<0,05, \*\*p<0,01. B) ME ile inkübe edilen yaşlı kardiyomiyositlerde MMP değişimi JC-1 Floresans boyası ile yüklenen hücrelerde konfokal mikroskobunda ölçüldü. Kontrol ve yaşlı (D-gal) grubu hücreleri 3 µM JC-1 ile 45 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. MMP yanıtı için hücrelere 1 µM FCCP verilmiş ve mitokondri depolarizasyonu sağlanmıştır. Veriler ortalama (± SS) olarak verilmiştir. Hücre sayısı her grup için n=20-35 hücredir. İstatistiksel anlamlılık \*p<0,05, \*\*p<0,01. Not: Yeşil renk, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını göstermektedir

ROS: Reaktif oksijen türleri, n.s: Anlamlı değil, SS: Standart sapma, ME: Magnolia ekstraktı



**Şekil 3:** ME ile inkübe edilmiş H9c2'lerde ER-stres ve apoptozis belirteç gen ifadesinin değişiminin qRT-PCR ile incelenmesi. ME ile inkübasyon yaşlı (D-Gal) kardiyomiyositlerde anlamlı olarak artan ER-stres belirteçleri olan A) Calregulin ve B) GRP78 ile apoptotik gen olan C) ENT1'in ifadesini inhibe etmektedir. *Beta-actin* gen ifadesi normalizasyon için kullanılmıştır. Sonuçlar relative CT metodu (2-deltaCt) ile analiz edilmiştir. n=3 ve veriler ortalama ± SS olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık \*p<0,05, \*\*p<0,01

ME: Magnolia ekstraktı, n.s: Anlamlı değil, ER: Endoplazmik retikulum, SS: Standart sapma

magnolol konsantrasyonunun anti-apoptotik Bcl-xl proteinlerinin modülasyonunu artırarak miyokard iskemisini ve reperfüzyon hasarı ile ilişkili kardiyomiyosit apoptozunu ve vasküler endotel hücre ölümünü önlediği gösterilmiştir (22). Ancak yaşlı kardiyomiyositlerde mitokondriyal disfonksiyon ve anormal ROS üretiminin neden olduğu kusurlu mitokondriyal otofaji/apoptozis ve ER-stres üzerindeki geri döndürücü etkileri literatürde çalışılmamıştır ve önceki bulgular, kalp hasarı ile ilgili tedavilerde kullanılan ME'nin mitokondriyal dinamikleri, apoptozis ve ER-stresi birbirine bağlayan sinyal yollarını düzenleyen fonksiyone bir terapötik ajan olarak geliştirilebileceğini düşündürmektedir. ME'nin yaşlı kardiyomiyositlerde apoptotik ve ER-stres belirteçlerini inhibe etmesi, bu hipotezimizi destekler niteliktedir.

### Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmanın en büyük sınırlaması in vitro deneylerin eksikliğidir. Yaşlı sıçan (veya fare) modellerinde ME'nin farklı doz konsantrasyonlarında gavaş yöntemi ile verilerek kardiyak yaşlanmadaki iyileşmenin hem elektrofizyolojik hem kalp dokusunda moleküler düzeyde incelenmesi mevcut sonuçları destekleyebilir. Böyle bir çalışma ayrıca ME'nin potansiyel diğer moleküler veya patofizyolojik hedeflerini de açığa çıkarabilir.

### Sonuç

Bulgularımız ile klinik olarak özellikle anti-enflamatuvar ve anti-tümörögenез ajanı olarak kullanılan Magnolia officinalis ekstraktının kardiyak yaşlanma üzerindeki etkisini literatürde ilk kez göstermekteyiz. Çalışmamızda, Magnolia Officinalis'in kardiyomiyosit yaşlanmasına bağlı artan ve KHV'lerin merkezinde rol alan oksidatif stres ve apoptozis üzerinde inhibitör bir ajan olarak rol alabileceğini önermekteyiz. Mitokondriyal fonksiyonun kardiyomiyosit fizyolojisindeki kritik rolü bilindiği için, özellikle mitokondriyal homeostazisin dengelenmesinde yararlanılacak yeni terapötik ajanların moleküler ve fonksiyonel olarak incelenmesi ve geliştirilmesi, geriatric kardiyoloji alanında da çok değerli olacaktır.

### Etik

**Etik Kurul Onayı:** Çalışma hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnsan ve hayvan deneyi içermemektedir. Bu nedenle etik kurul iznine gerek yoktur.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulunun dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma herhangi bir kurum, kuruluş ya da kişi tarafından finanse edilmemiştir.

### Kaynaklar

1. Dutta D, Calvani R, Bernabei R, et al. Contribution of impaired mitochondrial autophagy to cardiac aging: mechanisms and therapeutic opportunities. *Circ Res.* 2012;110:1125-1138.

2. Marzetti E, Wohlgemuth SE, Anton SD, et al. Cellular mechanisms of cardioprotection by calorie restriction: state of the science and future perspectives. *Clin Geriatr Med.* 2009;25:715-732.
3. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120:483-495.
4. Judge S, Jang YM, Smith A, et al. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J.* 2005;19:419-421.
5. Wei YH, Lee HC. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002;227:671-682.
6. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update. *Apoptosis.* 2003;8:115-128.
7. Durak A, Bitirim CV, Turan B. Titin and CK2 $\alpha$  are New Intracellular Targets in Acute Insulin Application-Associated Benefits on Electrophysiological Parameters of Left Ventricular Cardiomyocytes From Insulin-Resistant Metabolic Syndrome Rats. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2020;34:487-501.
8. Essick EE, Sam F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3:168-177.
9. Olgar Y, Tuncay E, Degirmenci S, et al. Ageing-associated increase in SGLT2 disrupts mitochondrial/sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> homeostasis and promotes cardiac dysfunction. *J Cell Mol Med.* 2020;24:8567-8578.
10. Olgar Y, Degirmenci S, Durak A, et al. Aging related functional and structural changes in the heart and aorta: MitoTEMPO improves aged-cardiovascular performance. *Exp Gerontol.* 2018;110:172-181.
11. Poivre M, Duez P. Biological activity and toxicity of the Chinese herb Magnolia officinalis Rehder & E. Wilson (Houpo) and its constituents. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2017;18:194-214.
12. Ho JH, Hong CY. Cardiovascular protection of magnolol: cell-type specificity and dose-related effects. *J Biomed Sci.* 2012;19:70.
13. Sun W, Zhang Z, Chen Q, et al. Magnolia extract (BL153) protection of heart from lipid accumulation caused cardiac oxidative damage, inflammation, and cell death in high-fat diet fed mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:205849.
14. Hong CY, Huang SS, Tsai SK. Magnolol reduces infarct size and suppresses ventricular arrhythmia in rats subjected to coronary ligation. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23:660-664.
15. Yuan Y, Zhou X, Wang Y, et al. Cardiovascular Modulating Effects of Magnolol and Honokiol, Two Polyphenolic Compounds from Traditional Chinese Medicine-Magnolia Officinalis. *Curr Drug Targets.* 2020;21:559-572.
16. Zhang Z, Chen J, Zhou S, et al. Magnolia bioactive constituent 4-O-methylhonokiol prevents the impairment of cardiac insulin signaling and the cardiac pathogenesis in high-fat diet-induced obese mice. *Int J Biol Sci.* 2015;11:879-891.
17. Zhang B, Zhai M, Li B, et al. Honokiol Ameliorates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Type 1 Diabetic Rats by Reducing Oxidative Stress and Apoptosis through Activating the SIRT1-Nrf2 Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:3159801.
18. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev.* 2014;94:909-950.
19. Li J, Zhang D, Brundel BJM, et al. Imbalance of ER and Mitochondria Interactions: Prelude to Cardiac Ageing and Disease? *Cells.* 2019;8:1617.
20. Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, et al. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33:1065-1089.
21. Karbowski M, Kurono C, Wozniak M, et al. Free radical-induced megamitochondria formation and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:396-409.
22. Terman A, Kurz T, Navratil M, et al. Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12:503-535.