



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.
2025; 39 (3): 181 - 188
<http://www.fusabil.org>

Emre KAYA^{1, a}
Seval YILMAZ^{1, b}
Harun USLU^{2, c}

¹ Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Ana Bilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

² Fırat Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Kimya Ana Bilim
Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-7445-3091

^b ORCID: 0000-0002-2040-9247

^c ORCID: 0000-0001-8827-8557

Nitrozomorfolin Uygulanan Ratların Kalp Dokusunda Pirüvat Kinaz Aktivitesi Üzerine Enginarın Etkisi: *In vitro* ve *in silico* Çalışmalar

Çalışmada, nitrozomorfolin (NMOR) ile tedavi edilen ratların kalp dokusunda pirüvat kinaz (PK) aktivitesi üzerine enginarın etkileri *in vitro* ve *in silico* olarak değerlendirilmiştir. Kontrol ve enginar gruplarında 7, diğer gruplarda 10 rat olacak şekilde 54 adet Wistar Albino erkek rat 6 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubundaki ratlara herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Diğer gruplara sırasıyla enginar (1.5 g/kg/gün), NMOR10 (10 mg/kg/gün), NMOR30 (30 mg/kg/gün), NMOR10 (10 mg/kg/gün)+enginar ve NMOR30 (30 mg/kg/gün)+enginar uygulanmıştır. Her iki madde de 14 gün boyunca belirtilen dozlarda gavaj yoluyla uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda kalp dokusunda PK aktiviteleri belirlenmiştir. Kontrol grubu ile enginar tedavi edilen grup arasında PK aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NMOR'un 10 ve 30 mg/kg dozlarında uygulandığı NMOR10 ve NMOR30 gruplarında kalp dokusu PK aktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0.013$ ve $p<0.001$). NMOR10 grubu ile karşılaştırıldığında NMOR10+Enginar grubunda, NMOR30 grubu ile karşılaştırıldığında da NMOR30+Enginar grubunda kalp dokusu PK aktivitelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $p=0.01$ ve $p=0.019$) olup bu grupların ortalamalarının kontrol grubu ortalamalarına yaklaştığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Moleküler doklama çalışmalarında fenolik bileşiklerden Sinarin'in 12.42 nanomolar, Luteolin'in 42.90 mikromolar, Sinarozid'in 69.62 mikromolar, Skolimosid'in ise 1.47 milimolar seviyede inhibisyon gerçekleştireceği hesaplanmıştır. Etkileşim modu, etkileştiği bağ türleri ve doklama skorları برابر değerlendirildiğinde PK inhibisyonu için sırasıyla Sinarin ve Luteolin'in daha etkin olacağı, sırasıyla Sinarozid ve Skolimosid'in ise nispeten daha az etkin olacağı bulunmuştur. Sonuçlar NMOR'un kardiyak dokudaki PK aktivitesini etkilediğini ve patogenezinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, enginar takviyesinin NMOR ile tedavi edilen ratların kalbinde düzenleyici bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nitrozomorfolin, enginar, kalp, pirüvat kinaz, moleküler doklama

Effect of Artichoke on Pyruvate Kinase Activity in Heart Tissue of Nitrosomorpholine-Treated Rats: *In vitro* and *in silico* Studies

In the study, the effects of artichoke on pyruvate kinase (PK) activity in the heart tissue of rats treated with nitrosomorpholine (NMOR) were evaluated *in vitro* and *in silico*. 54 Wistar Albino male rats were divided into 6 groups, 7 rats in the control and artichoke groups and 10 rats in the other groups. No treatment was performed on the rats in the control group. The other groups were administered artichoke (1.5 g/kg/day), NMOR10 (10 mg/kg/day), NMOR30 (30 mg/kg/day), NMOR10 (10 mg/kg/day)+artichoke and NMOR30 (30 mg/kg/day)+artichoke, respectively. Both substances were administered by gavage at the indicated doses for 14 days. At the end of the study, PK activities were determined in the heart tissue. There was no statistically significant difference in PK activity between control group and artichoke treated group. When compared with the control group, heart tissue PK activity was found to be lower in the NMOR10 and NMOR30 groups, where NMOR was administered at doses of 10 and 30 mg/kg ($p=0.013$ and $p<0.001$, respectively). Heart tissue PK activities were observed to be higher in the NMOR10+Artichoke group compared with the NMOR10 group, and in the NMOR30+Artichoke group compared with the NMOR30 group ($p=0.01$ and $p=0.019$, respectively), and it was observed that the means of these groups approached the means of the control group ($p>0.05$). It was calculated that Cynarin would inhibit at 12.42 nanomolar, Luteolin at 42.90 micromolar, Cynaroside at 69.62 micromolar, and Scolymoside at 1.47 millimolar levels. When the interaction mode, the types of bonds it interacts with, and docking scores were evaluated together, it was found that Cynarin and Luteolin would be more effective, respectively, while Cynaroside and Scolymoside would be relatively less effective, respectively, for PK inhibition. The results suggest that NMOR affects PK activity in cardiac tissue and may play a role in its pathogenesis. In addition, it has been observed that the artichoke supplementation has a regulatory effect in the heart of NMOR treated rats.

Key Words: Nitrosomorpholine, artichoke, heart, pyruvate kinase, molecular docking

Giriş

N-nitrozo bileşikler güçlü kanserojenler olup, bu bileşiklere mesleki ve çevresel maruziyetin insanlar ve diğer canlılar için potansiyel bir sağlık tehlikesi olduğu düşünülmektedir. N-nitrozo bileşiklerinin öncülleri olan nitritler ve sekonder aminler, birçok yaygın gıdada bulunur ve asidik koşullar altında, özellikle midede reaksiyona girebilir. Kauçuk endüstrisinde önemli bir kimyasal ara madde olarak bilinen sekonder amin morfolin (1), hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak nitrit varlığında kolayca N-nitrozomorfolin

Yazışma Adresi

Emre KAYA
Fırat Üniversitesi,
Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Ana Bilim Dalı
Elazığ – TÜRKİYE

emrekaya@firat.edu.tr

(NMOR)'e dönüştürülebilir. NMOR çoğunlukla lastik kimyasal fabrikalarının işyerlerinde, işlenmiş et ve sigara dumanında ve ayrıca kozmetik ürünlerinde bulunur. Bu molekül yaygın olarak rat hepatokarsinogeni olarak kullanılır ve N-dietilnitrozamin ile birlikte verildiğinde %100 akciğer metastazı olan hepatoselüler karsinom üretilebilir (1, 2).

Pirüvat kinaz (PK), şeker katabolizmasının glikolitik yolundaki son enzimdir. Bir protonun eklenmesi ve bir fosfo grubunun kaybıyla fosfoenolpirüvatın pirüvata dönüşümünü katalize eder ve bu ADP'ye aktarılır. Bu, glikolizin iki ATP oluşturan reaksiyonundan ikincisidir. PK tarafından katalize edilen reaksiyon esasen *in vivo* geri döndürülemezdir ve glikolizin fruktoz-1,6-bisfosfattan pirüvata doğru aşağı akış akışını düzenlemek için önemli bir kontrol noktası gibi görünmektedir (3).

Enginar (*Cynara scolymus* L) güçlü bir antioksidandır ve bu etkisinin yanında kolesterol düşürücü, antimikrobiyal özelliklerinin de olduğu rapor edilmiştir. Halk hekimliğinde irritable bağırsak sendromu ve hazımsızlık gibi şikayetlerde de kullanılmaktadır. Aktif bileşenlerin acı tadı ve suda çözünürlüğü nedeniyle tıbbi olarak sulu ekstraktlar ve kurutulmuş yaprakların çayları kullanılır (4). Enginar, besinsel ve fitokimyasal bileşimi nedeniyle sağlıklı bir gıda olarak kabul edilir. Proteinler, mineraller, düşük miktarda lipit, diyet lifi ve yüksek oranda fenolik maddeler içerir (5). Fenolik maddeler arasında sinarin (1,3-di-O-kafeoilkinik asit), luteolin, sinarozid (luteolin-7-O-glukozid), skolimosid (luteolin-7-rutinosid); kafeik, kumarik, hidroksisinnamik, ferulik, kafeoilkinik asit türevleri gibi fenolik asitler; klorojenik dahil mono- ve dikafeoilkinik asitler; asit alkoller; flavonoid glikozitler bulunur (5-7). Enginar, Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) olarak ifade edilen yüksek bir antioksidan kapasite sergiler (7, 8) ve Halvorsen ve ark. (9) en yüksek antioksidan içeriğine sahip 50 gıdanın sıralamasında onu 17. sıraya yerleştirmiş ve antioksidan içeriği porsiyon büyüklüğü açısından ifade edildiğinde de dördüncü sıraya ulaşmıştır. Fenoliklerin içeriği farklı çeşitlere, yaşa, bitkinin nesline, yetiştirme koşullarına, hasada, hasat sonrası ve depolama koşullarına ve kullanılan teknolojik prosedürlere göre değişir (6-8).

Moleküler doklama, bir molekülün (genellikle bir ilaç adayı) bir hedef proteine nasıl bağlandığını tahmin etmeye yarayan bilgisayar destekli bir yöntemdir. İlaç tasarımı, biyoteknoloji ve temel biyoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılır. Bu teknik; küçük bir molekülün (ligand), hedef protein veya enzim gibi büyük bir biyomolekülün (reseptör) bağlanma bölgesine nasıl yerleşeceğini (konformasyon) ve bağlanma gücünü (bağlanma afinitesi) simüle eder. Yeni ilaç adayları taranırken, binlerce molekül doklama ile test edilerek en iyi bağlananlar seçilir. Zamandan ve laboratuvar maliyetlerinden tasarruf sağlar (deneysel tarama yerine sanal tarama). Bir molekülün hangi cebe bağlandığı, hangi amino asitlerle etkileştiği gibi bilgiler elde edilir. Moleküler doklama sadece küçük moleküllerle değil, iki protein veya protein-DNA gibi büyük biyolojik yapılar arasında da yapılabilir. Proteinde yapılan bir mutasyonun, molekül bağlanmasını nasıl etkilediği doklama yoluyla simüle edilebilir (10, 11).

Bu çalışma ile farklı iki dozda NMOR uygulanan ratların kalp dokusunda PK aktivitesi üzerine enginarın etkisini araştırmak üzere, enginarın içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin (sinarin, luteolin, sinarozid, skolimosid vs.) moleküler doklama çalışmaları yapılarak fenolik bileşiklerden hangilerinin PK aktivitesi üzerinde daha etkili olduğunun anlaşılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma ve Yayın Etiği: Çalışma başlamadan önce, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'nın izni ile yapılmıştır (2025/12-02).

Hayvanlar ve Deneysel Düzen: Çalışmada Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Ünitesi'nden temin edilen 54 adet 2.5 aylık Wistar-Albino ırkı erkek ratlar kullanılmıştır. Deneysel uygulamalar, laboratuvar hayvanlarının bakımı ve kullanımı şartlarına uygun olarak yürütülmüştür. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari rat yemi (pelet yem) ve musluk suyu *ad libitum* sağlanmıştır. Kontrol grubu ratlara tedavi verilmemiştir. Diğer gruplar ise aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Deney grupları ve uygulamalar

Deney Grupları	Yapılacak Uygulamalar	Rat Adedi	Süre (Gün)
Grup 1	Herhangi bir uygulama yapılmamıştır (Kontrol grubu)	7	14
Grup 2	Enginar uygulanmıştır (14 gün)	7	14
Grup 3	NMOR10 - 10 mg/kg dozunda NMOR uygulanmıştır (10 mg/kg, gavaj, 14 gün)	10	14
Grup 4	NMOR30 - 30 mg/kg dozunda NMOR uygulanmıştır (30 mg/kg, gavaj, 14 gün)	10	14
Grup 5	NMOR10 (10 mg/kg, gavaj, 14 gün) + Enginar (1.5 g/kg, gavaj, 14 gün)	10	14
Grup 6	NMOR30 (30 mg/kg, gavaj, 14 gün) + Enginar (1.5 g/kg, gavaj, 14 gün)	10	14

Çalışmada toplam altı farklı deney grubu oluşturulmuştur ve uygulamalar 14 gün boyunca sürmüştür. Birinci grup kontrol grubu olup, herhangi bir uygulama yapılmamıştır. İkinci grupta yalnızca enginar uygulanmıştır (1.5 g/kg/gün dozunda, gavaj yoluyla). Üçüncü gruba, 10 mg/kg/gün dozunda NMOR (gavaj yoluyla), dördüncü grupta ise 30 mg/kg/gün dozunda NMOR uygulanmıştır. Beşinci gruba hem 10 mg/kg/gün dozunda NMOR hem de 1.5 g/kg/gün enginar birlikte uygulanmış. Altıncı ve son grupta ise 30 mg/kg/gün dozunda NMOR ile birlikte 1.5 g/kg/gün enginar uygulanmıştır (12, 13). NMOR ve enginar uygulamalarına aynı anda başlanmış ve 14 gün süre ile uygulamalara devam edilmiştir. Uygulamalarda kullanılan enginar, *Cynara scolymus* L. bitkisinin yapraklarından elde edilen toz ekstrenin distile suda hazırlanması ile uygulanmıştır (Arı Mühendislik, Ankara/Türkiye). NMOR ise Merck (USA, CAS No: 59-89-2) firmasından temin edilmiştir.

Biyokimyasal Analizler: Uygulamaların sonunda ratlar sakrifiye edilerek kalp dokuları alınmıştır. Kalp doku örnekleri fizyolojik tuzlu su çözeltisi ile yıkanmış, ağırlık-hacim oranına (1:10) göre distile su ile seyreltilmiş ve Potter-elvehjem homojenizatörü (CAT R50D, Almanya) kullanılarak homojenize edilmiştir. PK aktivite tayini için homojenatlar 13.500 rpm'de 55 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edilmiştir (NUVE NF800R, Türkiye). PK aktivitesi, Beutler ve ark. (14) tarafından modifiye edilen yöntemle 340 nm'de NADH'nin azalan absorpsiyon oranının ölçülmesine dayalı olarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Lowry ve ark. (15)'nin yöntemi doku homojenatındaki protein konsantrasyonunu belirlemek için kullanılırken, protein düzeyleri enzimin özgül aktivitesini hesaplamak için kullanılmıştır.

Moleküler Doklama Analizleri: Bu çalışmada, enginarla tespit edilen fenolik bileşiklerden bazılarının (Tablo 2) moleküler doklama sonuçları ortaya konulmuştur (Tablo 3). Bu bağlamda, *in vivo* biyokimyasal sonuçlar ve *in silico* moleküler doklama sonuçları karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir.

Enginar içeriğinde daha önce tespit edilen fenolik bileşiklerden Sinarin, Sinarozid Luteolin ve Skolimosid ligand olarak kullanılmıştır. Bu bileşiklerin kimyasal yapıları, PubChem (16)'den SMILES'ları alınarak ChemBioDraw Ultra 14.0 programı ile çizilmiştir. Bu ligandların enerji minimizasyonları ChemBio3D Ultra 14.0 programı ile gerçekleştirilmiştir. PK kristal yapısı protein veri bankasından alınarak, Autodock ve Maestro programlarıyla optimize edilmiştir (17-19). Izgara kutuları, daha önce PK'nın aktif bölgesi olarak belirlenen bölgeye göre 40x40x40 Å³ boyutlarında ve 0.375Å aralıklı olarak konumlandırılmıştır. Daha önce ki çalışmalarımızda moleküler doklama validasyonu için, 1A3X üzerinde kokristal ligand olarak bilinen 2-Fosfoglikolik asit (PDB ID: PGA) PK'nın hedef bölgesine yeniden yerleştirilmiş ve RMSD değerinin 1.31 olduğu belirlenmiştir (20). Her bileşik için PK için standart ayarlar kullanılarak en az 50 çalışma gerçekleştirilmiştir (PDB ID: 1A3X). Tüm moleküler doklama çalışmalarımızda Lamarckian Genetik Algoritması tercih edilmiş ve doklama puanları gibi

sonuçlar hem AutoDock 4.2 programı (21) hem de AutoDock Vina programı (22) kullanılarak elde edilmiş ve sunulmuştur (Tablo 3.).

Tablo 2. Enginarın içeriğinde bulunan bazı fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları

Bileşikler	Bileşiklerin Kimyasal Yapısı
Sinarin	
Sinarozid	
Luteolin	
Skolimosid	

Tablo 3. Enginarla bulunan bazı fenolik bileşiklerin PK (1A3X) üzerindeki moleküler doklama skorları, bağlanma tipleri ve tahmini inhibisyon sabitleri

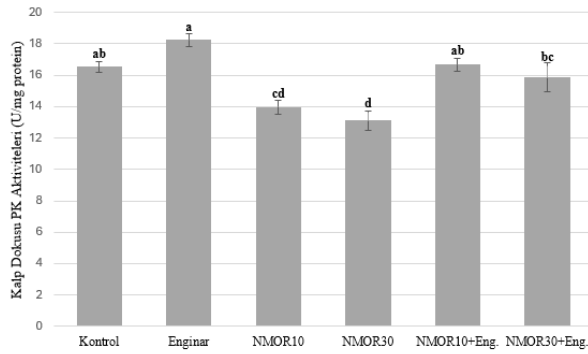
Bileşikler	AutoDock Sonuçları			AutoDock Vina Sonuçları	
	Etkileşen Kalıntılar	Etkileşim Türleri	Tahmini İnhibisyon Sabiti (Ki)	En İyi Dock Skor	En İyi Vina Skor
Sinarin	ASN51	Hidrojen bağı	12.42 nM	-10.79	-8.8
	ASN180	Hidrojen bağı			
	LYS240	Hidrojen bağı			
	ASP266	Hidrojen bağı			
	GLU302	Hidrojen bağı			
Sinarozid	MN1001	Metal Koord.	69.62 µM	-5.67	-9.1
	ASP266	Hidrojen bağı			
	GLN299	Hidrojen bağı			
	MN1001	Metal Koord.			
Luteolin	ARG49	Hidrojen bağı	42.90 µM	-5.96	-9.1
	LYS240	Pi-kasyon			
	MN1001	Metal Koord.			
	K1002	Pi-kasyon			
Skolimosid	ILE90	Hidrojen bağı	1.47 mM	-3.86	-10.0
	ASP147	Hidrojen bağı			
	VAL179	Hidrojen bağı			

nM: nanomolar; µM: mikromolar; mM: milimolar; Dock Skoru: Tahmini Bağlanma Serbest Enerjisi (kcal/mol); Koord.: Koordinasyon

İstatistiksel Analizler: Çalışma sonucunda elde edilen veriler, ortalama ve standart hata olarak sunulmuştur. İstatistiksel anlamlılık, $p < 0.05$ seviyeleri için değerlendirilmiş ve bu değer anlamlı kabul edilmiştir. Ölçülen tüm parametrelerin normal dağılıma uyup uymadığını belirlemek için Shapiro-Wilk normallik testi yapılmış ve sonuçlar, tüm parametrelerin normal dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgulara dayanarak, gruplar arasındaki farklılıkları incelemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve ikili karşılaştırmalar için *post hoc* Tukey testi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analizler, SPSS 22 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

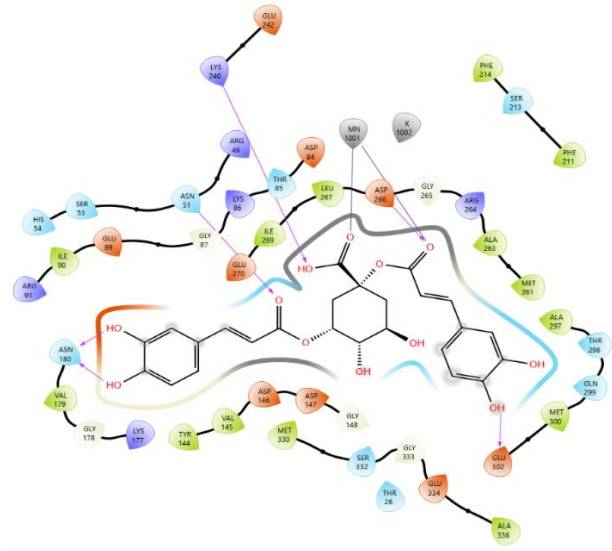
Bulgular

Biyokimyasal Sonuçlar: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NMOR'un 10 ve 30 mg/kg dozlarında uygulandığı NMOR10 ve NMOR30 gruplarında kalp dokusu PK aktivitesinin düşük olduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0.013$ ve $p<0.001$). NMOR10 grubu ile karşılaştırıldığında NMOR10+Enginar grubunda, NMOR30 grubu ile karşılaştırıldığında da NMOR30+Enginar grubunda kalp dokusu PK aktivitelerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (sırasıyla $p=0.01$ ve $p=0.019$) olup bu grupların ortalamalarının kontrol grubu ortalamalarına yaklaştığı gözlenmiştir ($p>0.05$) (Şekil 1).

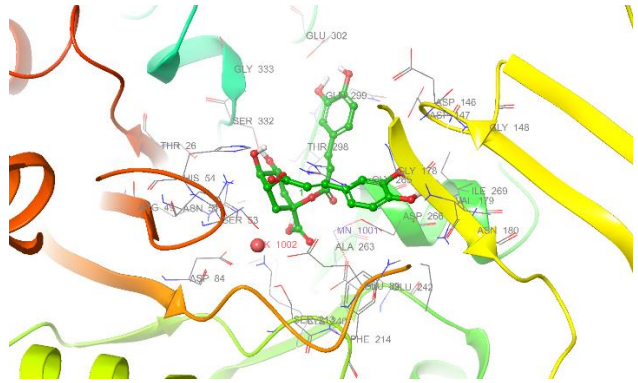


Şekil 1. Kalp dokusu PK aktiviteleri (U/mg protein)

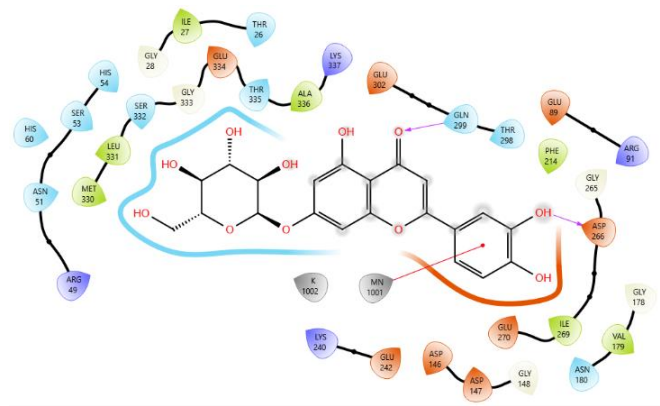
Moleküler Doklama Çalışması: Sinarin'in moleküler doklama pozisyonları incelendiğinde ASN51, ASN180, LYS240, ASP266 ve GLU302 ile hidrojen bağı yaptığı buna ek olarak MN1001 ile de metal koordinasyonu gösterdiği görülmüştür. Sinarozid'in moleküler doklama pozisyonları incelendiğinde ASP266 ve GLN299 ile hidrojen bağı yaptığı buna ek olarak MN1001 ile de metal koordinasyonu gösterdiği görülmüştür. Luteolin'in moleküler doklama pozisyonları incelendiğinde ARG49 ile hidrojen bağı yaptığı buna ek olarak LYS240 ve K1002 ile Pi katyon ve MN1001 ile de metal koordinasyonu gösterdiği görülmüştür. Skolimosisid'in moleküler doklama pozisyonları incelendiğinde ILE90, ASP147 ve VAL179 ile hidrojen bağı yaptığı görülmüştür (Şekil 2-9, Tablo 3).



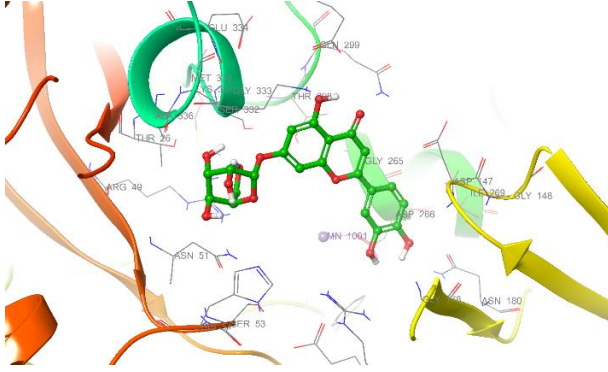
Şekil 2. PK (1A3X) ile Sinarin'in 2D etkileşim diyagramı



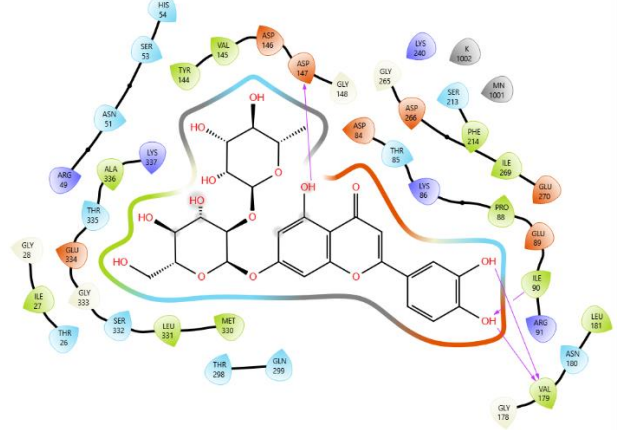
Şekil 3. PK (1A3X) ile Sinarin'in 3D etkileşim diyagramı



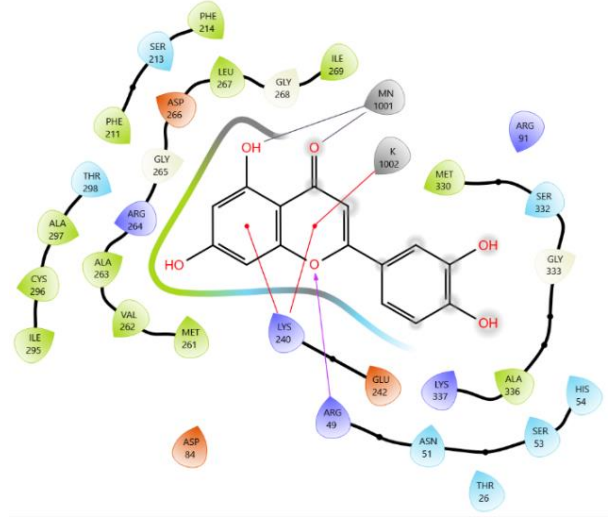
Şekil 4. PK (1A3X) ile Sinarozid'in 2D etkileşim diyagramı



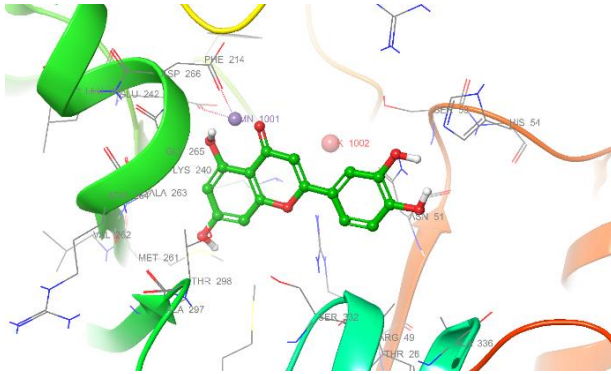
Şekil 5. PK (1A3X) ile Sinarozid'in 3D etkileşim diyagramı



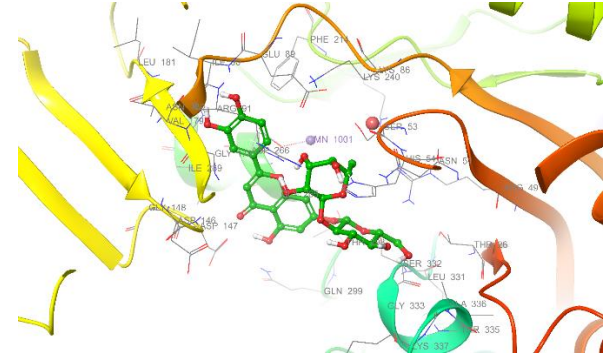
Şekil 8. PK (1A3X) ile Skolimosid'in 2D etkileşim diyagramı



Şekil 6. PK (1A3X) ile Luteolin'in 2D etkileşim diyagramı



Şekil 7. PK (1A3X) ile Luteolin'in 3D etkileşim diyagramı



Şekil 9. PK (1A3X) ile Skolimosid'in 3D etkileşim diyagramı

Tartışma

Son yıllarda enginar, belirtilen çok sayıda avantajı nedeniyle tıbbi ve olası koruyucu bir ajan olarak büyük ilgi görmektedir. NMOR'un kalp üzerindeki etkileri biyokimyasal olarak incelenerek, NMOR ile ilişkili kalp dokusu PK aktivitesine enginarın olası etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda enginarın içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin (sinarin, luteolin, sinarozid, skolimosid vs.) moleküler doklama çalışmaları yürütülmesi ile bu *in silico* araştırma sonucunda fenolik bileşiklerden hangilerinin PK aktivitesi üzerinde daha etkili olduğu sayısal olarak tablolar halinde ve görsel olarak şekiller üzerinde detaylı olarak açıklanmaya çalışılmıştır.

Çalışmada, enginar uygulaması sonrası PK aktivitelerinin kontrol grubunun sonuçlarına önemli ölçüde yaklaştığı görülmektedir. Yılmaz ve ark. (20), glikolizde anahtar bir enzim olan PK üzerine propolis ve bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutazın, doksorubisin kaynaklı toksisite üzerine farklı dokulardaki etkisini değerlendirmeyi amaçlayan çalışmalarında, mevcut çalışmada olduğu gibi zararlı etkileri de olduğu bilinen doksorubisin uygulandıktan sonra böbrek dokusu da dahil olmak üzere birçok dokuda PK aktivitelerinde azalma olduğunu bulmuşlardır. Ratların karaciğer ve böbrek dokularında streptozotisin ile indüklenen diyabet çalışmasında PK enzim aktivitelerindeki değişiklikleri inceleyen bir çalışmada, diyabetin 3. gününde böbrek dokusundaki PK aktivitelerinin istatistiksel olarak anlamsız bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, diyabet sonrası karaciğer dokusunda PK aktivitesinin azaldığı da belirtilmiştir (23). Uslu ve ark. (24), doksorubisin ile tedavi edilen ratlarda böbrek dokusunda PK aktivitesi üzerine nigella sativa yağının etkisini ve nigella sativa yağındaki aktif bileşenler ile PK arasındaki ilişkiyi *in silico* moleküler yerleştirme ile inceledikleri çalışmalarında kanser tedavisinde kullanılan ve toksik etkileri de olan doksorubisin uygulaması sonrası böbrek dokusunda PK aktivitelerinin azaldığını saptamışlardır. Klimek ve Bannasch (25), ratlarda NMOR ile oluşturulan preneoplastik ve neoplastik karaciğer lezyonlarında PK aktivitesinin biyokimyasal mikroanalizi yaptıkları çalışmada, NMOR'a bağlı gelişen bazofilik hepatik tümörlerde PK aktivitesinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Araştırmacılar (26, 27), PK aktivitesindeki azalmanın glikojenotik odaklardan hepatosellüler karsinomlara giden hücresel değişiklikler dizisi sırasında meydana geldiğini öne sürmüşlerdir. PK eksikliği, invertebratlardan memelilere kadar birçok türde metabolik dengesizliklere yol açmaktadır. Bu durum, glikoliz yolunun bozulması ve enerji üretiminin azalması gibi sonuçlara neden olur. PK ve PKM2 gibi izozimleri, farklı fizyolojik koşullar altında hücre metabolizmasını ve büyümesini düzenleyen kritik bir enzimlerdir. Bunlar, nötrofillerde reaktif oksijen türleri üretimini düzenler. PK ve izozimlerinin eksikliği, bakteriyel öldürme yeteneğini azaltır ve glikoliz yolunun önemli bir bileşeni olan dihidroksi aseton fosfat üretimini bozar ve sonucunda hem enerji metabolizması aksar hem de reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı oksidatif stresle ilişkili sonuçlar meydana gelir (28). Mevcut çalışmada NMOR uygulamaları sonrası düşmüş olan PK aktivitesinin enginar uygulaması sonrası artması, içeriğinde bulunan aktif fenolik bileşiklerin (sinarin, sinarozid, luteolin gibi) glikoliz yolunu aktive ederek ATP üretimini artırması ve 2,3-difosfoglisarat seviyelerini düşürmesi ile allosterik olarak PK aktivatörü gibi etki etmesiyle açıklanabilir.

Bu çalışmada, NMOR uygulamasından sonra PK aktivitesi azalmıştır ve bu azalmanın PK sentezindeki azalmadan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Glikolitik yolun enzimlerinden biri olan PK, glikoz metabolizmasında anahtar bir enzimdir. Bu durum, mutajen ve kanserojen bir organik bileşik olan NMOR'un PK enziminin gen transkripsiyon seviyesinde azalmaya neden olabileceğini de düşündürmelidir. PK ve izozimlerinin spesifik inhibitörü olan Compound 3K'nın,

PK'nın aktivitesini inhibe ederek mTOR yollarını etkilediği ve gen ekspresyonunu dolaylı olarak etkileyebileceği (28), Rottlerin ve hypericin gibi kinaz inhibitörlerinin, transkripsiyonel aktiviteyi baskılayarak PK'nın transkripsiyonel rolünü dolaylı olarak etkileyebileceği (29) bazı çalışmalar ile gösterilmiştir. Çalışmamızda da etkileri incelenen NMOR'un PK enzimi üzerindeki etkileri, mevcut literatürde doğrudan incelenmemiştir. Ancak, NMOR'un gen ekspresyonu üzerindeki etkileri dolaylı olarak PK'nın ekspresyonunu etkileyebilir. NMOR'un karaciğer dokusundaki etkilerini inceleyen bir çalışmada, NMOR tedavisi sonrası PK ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir (30). Bu durum, NMOR'un PK ekspresyonunu artırabileceğini düşündürmektedir. Ancak, araştırmacılar bu artışın gen transkripsiyonunun doğrudan bir sonucu olup olmadığı konusunda kesin bir bilgi sunmamışlardır.

Memeli hücrelerinin savunma mekanizmalarını destekleyen doğal antioksidan kaynaklarına olan ilgi artmaktadır. Bu kaynaklardan biri, esas olarak Akdeniz bölgesinde insan tüketimi (alt çiçek) ve tıbbi amaçlar (otlar ve yapraklar) için yetiştirilen bir sebze olan enginar (*Cynara scolymus* L.). Bu bitki çok sayıda aktif bileşik içerir (31). Mevcut çalışmada hem PK aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir, hem de enginarın aktif bileşenleri ile PK arasındaki ilişki *in silico* moleküler yerleştirme çalışmaları ile belirlenmiştir. Enginar uygulaması ile PK aktivitesi üzerine doğrudan yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamış olsa da glikoz metabolizmasında bir enzim olan PK'nın enginarın aktif bileşenlerinin etkisi ile aktivitesinin değişebileceği düşünülmektedir. Enginar ekstraktları insülin sinyal yolları, glikoz metabolizması ve antioksidan aktivite üzerinden etkilerini gösteriyor; bu yüzden PK seviyeleri üzerindeki etkisi teorik olarak mümkündür. Çalışmada, NMOR'un her iki dozunda da düşük gözlenen PK aktiviteleri enginar uygulamaları sonrası yüksek bulunmuştur. Bu da enginar ekstraktlarının insülin sinyal yolları, glukoz metabolizması ve antioksidan aktivite üzerinden etkilerini göstermesi ile açıklanabilir.

Reseptör 1A3X'in aktif bağlanma bölgesi daha önce protein veri tabanında belirlenmiştir. ARG49, LYS240, ALA263, ARG264, GLY265, THR298, MN1001 ve K1002 kalıntılarının etkileşimde önemli olduğu vurgulanmıştır (17). Bu veriler göz önüne alınarak, enginarın bulunan bazı fenolik bileşiklerin makromolekülün aktif bölgesiyle etkileşim modlarını görmek için moleküler doklama çalışmaları yapılmıştır. Etkileşim tipleri ve aminoasit kalıntıları Maestro viewer programı yardımıyla ayrıntılı olarak 2D ve 3D olarak sunulmuştur. (Tablo 3, Şekil 2-9). 2-Fosfoglikolik asit'in (PDB ID: PGA) etkileştiği rezidüel ile karşılaştırıldığında Sinarin, Sinarozid ve Luteolin'in de benzer şekilde LYS240, MN1001 ve K1002 ile etkileştiği ancak Skolimosid'in bu farklı rezidüellerle etkileştiği ve nispeten diğer ligandlara göre doklama skorunun da düşük olduğu tespit edilmiştir. Skolimosid'in kimyasal yapısının diğerlerine nazaran nispeten daha büyük oluşunun bağlanma bölgesinde konumlanması üzerinde olumsuz etki oluşturduğu düşünülebilir. PK üzerinde Sinarin'in nanomolar seviyede, Sinarozid ve Luteolin'in

mikromolar seviyede, Skolimosid'in ise milimolar seviyede inhibisyon gerçekleştireceği hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, *in silico* analizlerde PK üzerinde sinarin, sinarozid ve luteolin'in 2-fosfoglikolik asit ile benzer şekilde etkileşim gösterdiği ve PK inhibisyonu açısından daha etkin olduğu ortaya çıkmıştır. Skolimosid'in bu anlamda hem etkileşim modu hem de doklama skorunun daha az iyi olduğu ve PK inhibisyonunun da daha az etkin olacağı bulunmuştur. Ayrıca çalışma, NMOR uygulamasının rat kalp dokusunda PK aktivitesini anlamlı şekilde azalttığını, ancak enginar desteğinin bu olumsuz etkiyi kısmen

düzelterek PK aktivitesini kontrol seviyelerine yaklaştırdığını ortaya koymuştur. Moleküler doklama analizleri, enginar da bulunan fenolik bileşiklerden özellikle sinarin, sinarozid ve luteolinin PK ile güçlü etkileşimler sergilediğini ve en etkili inhibitörler arasında yer aldığını göstermiştir. Elde edilen bulgular, enginarın antioksidan içeriği sayesinde NMOR kaynaklı kardiyak metabolik bozukluklarda düzenleyici bir ajan olarak potansiyel taşıyabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, elde edilen sonuçların klinik açıdan doğrulanabilmesi için ileri düzeyde *in vivo* ve klinik araştırmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Kitano M, Takada N, Chen T, et al. Carcinogenicity of methylurea or morpholine in combination with sodium nitrite in a rat multi-organ carcinogenesis bioassay. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 797-806.
2. Robichová S, Slameňová D, Gábelová A, Sedlák J, Jakubíková J. An investigation of the genotoxic effects of N-nitrosomorpholine in mammalian cells. *Chem Biol Interact* 2004; 148: 163-171.
3. Xie W, He Q, Zhang Y, et al. Pyruvate kinase M2 regulates mitochondrial homeostasis in cisplatin-induced acute kidney injury. *Cell Death Dis* 2023; 14: 663.
4. Holtmann G, Adam B, Haag S, et al. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: A six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 1099-1105.
5. Fratianni F, Tucci M, De Palma M, Pepe R, Nazzaro F. Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). *Food Chem* 2007; 104: 1282-1286.
6. Sánchez-Rabaneda F, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, et al. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003; 1008: 57-72.
7. Lutz M, Henríquez C, Escobar M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J Food Compos Anal* 2011; 24: 49-54.
8. Wu X, Beecher GR, Holden JM, et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4026-4037.
9. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr* 2006; 84: 95-135.
10. Paggi JM, Pandit A, Dror RO. The art and science of molecular docking. *Annu Rev Biochem* 2024; 93.
11. Asiamah I, Obiri SA, Tamekloe W, Armah FA, Borquaye LS. Applications of molecular docking in natural products-based drug discovery. *Sci Afr* 2023; 20: e01593.
12. Mehmetçik G, Ozdemirler G, Koc NT, Cevikbas U, Uysal M. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol* 2008; 60: 475-480.
13. Ashby J, Lefevre PA. The rat-liver carcinogen N-nitrosomorpholine initiates unscheduled DNA synthesis and induces micronuclei in the rat liver in vivo. *Mutat Res Lett* 1989; 225: 143-147.
14. Beutler E, Blume KG, Kaplan JC, et al. International Committee for Standardization in Haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 1977; 35: 331-340.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
16. PubChem. "U.S. National Library of Medicine". <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/03.07.2025>.
17. Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, et al. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Struct* 1998; 6: 195-210.
18. RCSB. "The Protein Data Bank". <https://www.rcsb.org/structure/1a3x/03.07.2025>.
19. Schrödinger M. Maestro Schrödinger. LLC, New York, 2025.
20. Yılmaz S, Kaya E, Yonar H, Uslu H. Effect of propolis on pyruvate kinase and superoxide dismutase activities in doxorubicin-induced tissue damage: Molecular docking analysis. *Rev Cient Fac Cienc Vet Univ Zulia* 2024; 34: 11.
21. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 2009; 30: 2785-2791.
22. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 2010; 31: 455-461.
23. Yılmaz S, Üstündağ B. The levels of pyruvate kinase activity in renal and hepatic tissues of rats with diabetes induced by streptozotocin. *Turk J Vet Anim Sci* 2002; 26: 549-553.
24. Uslu H, Kaya E, Yılmaz S. Effect of Nigella sativa oil on pyruvate kinase activity in kidney tissue in doxorubicin-treated rats: ADME predictions and molecular docking studies. *FU Vet J Health Sci* 2025; 39(1): 15-21.
25. Klimek F, Bannasch P. Biochemical microanalysis of pyruvate kinase activity in preneoplastic and neoplastic liver lesions induced in rats by N-nitrosomorpholine. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1377-1380.

26. Waller TJ, Collins CA, Dus M. Pyruvate kinase deficiency links metabolic perturbations to neurodegeneration and axonal protection. *Mol Metab* 2025;102187.
27. Toller-Kawahisa JE, Hiroki CH, Silva CMDS, et al. The metabolic function of pyruvate kinase M2 regulates reactive oxygen species production and microbial killing by neutrophils. *Nat Commun* 2023; 14: 4280.
28. Park JH, Kundu A, Lee SH, et al. Specific pyruvate kinase M2 inhibitor, compound 3K, induces autophagic cell death through disruption of the glycolysis pathway in ovarian cancer cells. *Int J Biol Sci* 2021; 17: 1895.
29. Morachis JM, Huang R, Emerson BM. Identification of kinase inhibitors that target transcription initiation by RNA polymerase II. *Oncotarget*. 2011; 2: 18.
30. Steinberg P, Klingelhöffer A, Schäfer A, et al. Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats. *Virchows Arch* 1999; 434: 213-220.
31. Florek E, Szukalska M, Markiewicz K, et al. Evaluation of the protective and regenerative properties of commercially available artichoke leaf powder extract on plasma and liver oxidative stress parameters. *Antioxidants* 2023; 12: 1846.