



HİSPİDULİNİN SAĞLIKLI HÜCRE HATLARINDA SİTOTOKSİK, APOPTOTİK VE NEKROTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ferhunde AYSİN^{1*}

¹Atatürk University, Faculty of Science, Department of Biology, 25240, Erzurum, Türkiye.

²Atatürk University, Eastern Anatolia High Technology Application and Research Center, 25240, Erzurum, Türkiye

Özet: Hispidulin çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olmasından dolayı uzun süredir kanser araştırmalarında kullanılmaktadır ancak bu maddenin sağlıklı hücrelerde sitotoksik etkisiyle ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada ilk defa, hispidulin geniş doz aralığında (0-800 µM) sağlıklı hücre hatları ile denendi ve kullanımının güvenliği MTT ve Akım sitometrisi analizleriyle değerlendirildi. Bu amaçla, İnsan akciğer fibroblastı (MRC-5), Sıçan Primer Akciğer Fibroblastı (RA-6013) ve Sıçan Primer Trakeal Fibroblastı (RA-6217) hücreleri 48 saat boyunca hispidulinle muamele edildi. Hispidulin, düşük dozlarda hücre canlılığı üzerinde önemli etkiler göstermedi ancak özellikle 400 ve 800 µM dozlarında hücrelerin canlılığında istatistiksel anlamda ciddi bir azalmaya neden oldu. Hispidulinin IC50 değeri, MRC-5 hücreleri için 563.63 µM, RA-6013 hücrelerinde 194.30 µM ve RA-6217 hücrelerinde ise 311.98 µM olarak belirlendi. Ayrıca 800 µM hispidulin, tüm sağlıklı hücreler üzerinde güçlü apoptotik ve nekrotik etki gösterdi. Sonuçlarımız, hispidulinin düşük dozlarda (0-200 µM) sağlıklı hücrelerde antisitotoksik nitelikte olduğunu ve gelecekteki kanser ve solunum yolu hastalıkları tedavisi için güvenilir doğal bir bileşik olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Hispidulin, MRC-5, RA-6013, RA-6217, Sitotoksosite


Evaluation of Cytotoxic, Apoptotic, and Necrotic Efficiency of Hispidulin in Healthy Cell Lines

Abstract: Since hispidulin has various pharmacological properties, its use in cancer research has been increasing for a long time, but there are very limited studies on its cytotoxic effect in healthy cells. In this study, for the first time, the safety of hispidulin in a wide dose range (0-800 µM) was evaluated on healthy cell lines by MTT and Flow cytometry assays. For this purpose, Human lung fibroblast (MRC-5), Rat Primary Lung Fibroblast (RA-6013), and Rat Primary Tracheal Fibroblast (RA-6217) cells were treated with hispidulin for 48 hours. Hispidulin did not show significant effects on cell viability at low doses; however, caused a statistically significant reduction in cell viability, especially at doses of 400 and 800 µM. The IC50 value of hispidulin was determined as 563.63 µM for MRC-5 cells, 194.30 µM for RA-6013 cells, and 311.98 µM for RA-6217 cells. Moreover, 800 µM hispidulin showed a strong apoptotic and necrotic effect on all healthy cells. Our results show that hispidulin is anticytotoxic in healthy cells at low doses (0-200 µM) and has the potential to be a safe natural compound for future treatment of cancer and respiratory diseases.

Keywords: Hispidulin, MRC-5, RA-6013, RA-6217, Cytotoxicity

*Sorumlu yazar (Corresponding author): Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümüm, Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (DAYTAM), 25240, Erzurum, Türkiye.

E mail: ferhundeaysin@gmail.com (F. AYSİN)

Ferhunde AYSİN  <https://orcid.org/0000-0003-1971-8031>

Gönderi: 23 Ocak 2023

Kabul: 29 Nisan 2023

Yayınlanma: 01 Temmuz 2023

Received: January 23, 2023

Accepted: April 29, 2023

Published: July 01, 2023

Cite as: Aysin F. 2023. Evaluation of cytotoxic, apoptotic, and necrotic efficiency of hispidulin in healthy cell lines. BSJ Eng Sci, 6(3): 193-198.

1. Giriş

Modern tıbbın insan hastalıklarına karşı tam tedaviyi sağlayabilecek nitelikte olmaması ve yan etkilerin ortaya çıkması nedeniyle son yıllarda doğal ve bitkisel kaynaklı tedaviye dünya genelinde artan bir ilgi vardır. Bitkilerin içerdiği aktif bileşiklerin insan vücudunda sinerjistik etki göstermesi yan etkisi olmayan veya çok az olan, güçlü bir tedaviyi sağlayabilmektedir (Kaufman, 1998). Ancak kanser konusunda mevcut tedavi stratejilerinin bazılarında ilaç direncinin üstesinden gelmek, ayrıca tümöral olmayan hücreler için daha güvenli ve daha az toksik olan ilaçları bulmak adına yeni kanser tedavilerine ihtiyaç vardır (Lin ve ark., 2017). Hispidulin (6-methoxy-5,7,4'-trihydroxyflavone), yüksek farmakolojik potansiyele sahip doğal bileşikler arasındadır.

Laboratuvar ve kliniklerde çokça çalışılan hispidulin, çeşitli bitkilerde bulunan doğal bir flavon türevidir (Mocan ve ark., 2015; Patel ve ark., 2017). Çalışmalar, hispidulinin güçlü antioksidan (Lin ve ark., 2014), anti-enflamatuar (An ve ark., 2018), nöroprotektif (Huang ve ark., 2018), anti-epileptik (Lin ve ark., 2012), antimutajenik ve antitümör (Yu ve ark., 2013; Gao ve ark., 2015) aktiviteler dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik özellikler sergilediğini göstermiştir. Dahası hispidulinin, kökenlerine ve genetik yapılarına bakılmaksızın, birçok insan kanserine karşı düşük dozlarda bile geniş spektrumlu bir sitotoksositeye sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu flavonun, hücre bölünmesini ve büyüme kontrol yollarını, apoptozu, enflamasyonu, anjiyogenez ve metastazı modüle ederek karsinogenezin her üç



aşamasında da (başlangıç, ilerleme ve ilerleme) etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Ashaq ve ark., 2021). Bu umut verici etkilerine rağmen hispidulinin zararlı etkisi ve optimum biyoyararlanımı üzerine araştırmalar çok sınırlıdır. Bilindiği üzere kanser tedavisi genotoksik ajanların kullanımına dayanmakta ve kullanılan ajanın optimum biyoyararlanımını için doz seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir (Kavakcıoğlu Yardımcı ve ark., 2021). Farmasötik sitotoksik ilaçların aksine, hispidulinin normal hücreler üzerinde *in vivo* hayvan modeli çalışmalarından da anlaşılacağı gibi çok düşük veya ihmal edilebilir düzeyde sitotoksik etkisi vardır. Diğer taraftan hispidulinin tümöral akciğer ve trake hücreleri de dâhil olmak üzere çeşitli kanserli hücre hatlarında antiproliferatif etkilerine dair kanıtlara rağmen sağlıklı hücre hatlarında *in vitro* sitotoksik etkilerini rapor eden hiçbir güncel veri yoktur. Bu nedenle mevcut çalışmada, hispidulinin geniş doz aralığında İnsan Akciğer Fibroblastı (MRC-5), Sıçan Primer Akciğer Fibroblastı (RA-6013) ve Sıçan Primer Trake Fibroblastı (RA-6217) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri test edildi. Bu fibroblast hücre hatları, normal insan akciğer, normal sıçan akciğer ve trake epiteline yapısal benzerliği nedeniyle toksisite çalışmalarında yaygın şekilde bir model olarak kullanıldığı için tercih edildi (Kavakcıoğlu Yardımcı ve ark., 2021, Wilcox ve Edelman, 2022).

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Kimyasallar ve Hücre kültürleri

MRC-5 (İnsan akciğer fibroblastı) (Kat No. CCL-171™, ATCC®), RA-6013 (Sıçan primer akciğer fibroblastı) (Kat. No. M2267, Cell Biologics) ve RA-6217 (Sıçan primer trake fibroblastı) (Kat. No. M2267, Cell Biologics) hücre hatları Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (DAYTAM) (Atatürk Üniversitesi, Erzurum, Türkiye) tarafından temin edildi. Araştırma için kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktaydı ve Sigma-Aldrich, Inc.'den (St. Louis, MO, ABD) temin edildi.

2.2. Sitotoksik Testler

Hücre canlılığı, mitokondriyal aktiviteyi değerlendirmek için çok yönlü olan ve sıklıkla kullanılan MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testiyle belirlendi. MRC-5, RA-6013 ve RA-6217 hücre hatları, sırasıyla yüksek glukozlu DMEM ve DMEM/F12 besiyerinde kültürlendi. Her iki besiyerine de 100 IU/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve %10 fetal sığır serumu (FBS) katıldı ve hücreler 37 °C'de %5 CO₂ ile %95 nem sağlayan inkübatörde büyütüldü. Her bir hücre hattı, kuyu başına 150 µl olacak şekilde 1×10⁴ yoğunlukta 96 kuyulu plakalara eşit şekilde ekildi ve bir gün boyunca 37 °C'de CO₂ inkübatörüne uygulama öncesi çoğalmaya bırakıldı. Stok solüsyonu hazırlamak için hispidulin, dimetilsülfoksit (DMSO) (%0,1 v/v) içinde sonikatör kullanılarak çözüldü ve sonrasında seyreltilti. Her bir hücre hattı, 48 saat boyunca 0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 µM arasında değişen farklı konsantrasyonda hispidulin flavonuyla muamele edildi.

Pozitif kontrol olarak 500 µM H₂O₂ kullanıldı. İnkübasyonun sonunda her bir kuyuya fosfat tamponlu salin (PBS) içinde 20 µl 5 mg/ml MTT ilave edildi ve plakalar, 37 °C'de CO₂ inkübatörüne yerleştirildi. 4 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklardan süpernatant çıkarıldı ve oluşan formazan ürünü (mavi-mor kristaller), 150 µl DMSO ilave edilerek çözüldü. Canlı hücreler tarafından üretilen çözünür formazan ürününün absorbansı, Epoch mikropilaka okuyucusunda (BioTek, ABD) 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Hücre canlılığı, kontrol grubunun absorbansı %100 kabul edilerek aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi (eşitlik 1);

$$\% \text{ Canlı hücre} = \frac{(\text{Hispidulinle muamele edilen hücrenin absorbansı}) - (\text{boş kuyucuğun absorbansı})}{(\text{Kontrol hücre absorbansı}) - (\text{boş kuyucuğun absorbansı})} \times 100 \quad (1)$$

2.3. Annexin V-FITC ve PI analizi

MRC-5, RA-6013 ve RA-6217 hücre hatlarında hispidulinin etkisiyle meydana gelen apoptotik ve nekrotik hücre ölümünün kantitatif tayini, Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC ile üreticinin protokolü (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI, BioLegend) izlenerek yapıldı. Özetle, kontrol ve ajanlarla muamele edilen tüm hücreler toplandı, ardından PBS ve 1X bağlama tamponu ile 1500 rpm'de 5 dakika santrifüjleme yapılarak yıkandı. Daha sonra 1×10⁶ hücre, 1 ml 1X bağlama tamponunda yeniden süspansiyon edildi. Her 100 µl hücre süspansiyonuna 5 µl florokrom-konjuge Annexin V eklendi ve oda sıcaklığında ışıktan koruyarak 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Tüm hücreler tekrar 1X bağlama tamponunda yıkandıktan sonra 200 µl aynı tamponda yeniden süspansiyon edildi ve 5 µl propidyum iyodür (PI) eklendi. Boyalı hücreler, bağlama tamponu ile seyreltilti ve tüm örnekler DAYTAM'da bulunan Beckman Coulter CytoFLEX Flow Sitometresi ile analiz edildi. Floresans dağılımı, iki renkli nokta çizimi analizi olarak gösterildi ve her kadradaki floresan hücrelerin yüzdesi ölçüldü.

2.4. İstatistik Analiz

Veriler, ortalama ±S.E.M olarak sunuldu. Varyanstaki farklılıklar için Graphpad prism 6.0 istatistik yazılımında (GraphPad, La Jolla, CA, ABD) tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırmaları kullanıldı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları belirtmek için P<0,05 kabul edildi.

3. Bulgular

3.1. Hispidulinin MRC-5, RA-6013 ve RA-6217 Hücreleri Üzerinde Sitotoksik Etkisi

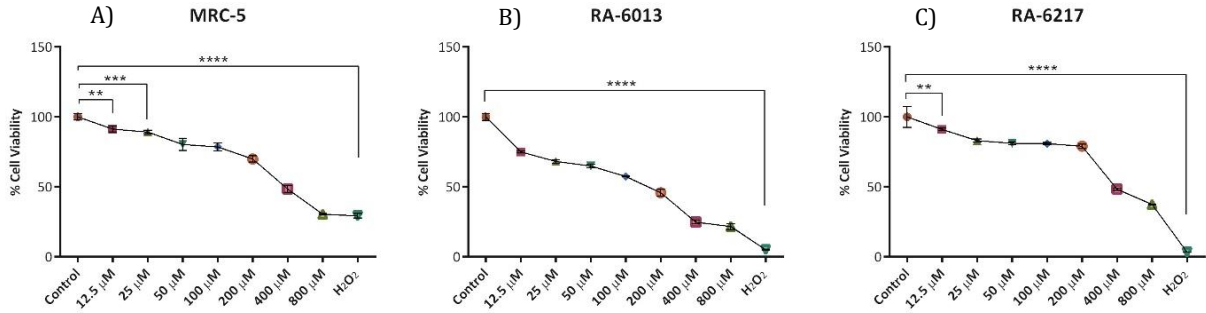
Hispidulin 12,5–800 µM konsantrasyon aralığında, 48 saat süreyle MRC-5, RA-6013 ve RA-6217 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri sırasıyla Şekil 1A, B ve C'de gösterilmiştir. Şekil 1A'dan görüldüğü gibi 48 saat boyunca 12,5–200 µM arası konsantrasyonlarda hispidulinle muamele edilen MRC-5 hücreleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücre canlılığında önemli bir değişikliğe neden olmadı ve canlılık yüzdeleri

sırasıyla %91,31, %89,18, %80,33, %78,57 ve %69,96 olarak belirlendi. Öte yandan, daha yüksek hispidulin konsantrasyonları (400 ve 800 μM), tedavi periyodu için insan akciğer fibroblast hücresi canlılığını %48,38 ve %30,40 olmak üzere önemli ölçüde azalttı. Aynı hücre hattında 48 saat boyunca H_2O_2 (500 μM) ile muamele ise hücre canlılığını %29,32'ye kadar düşürdü.

Şekil 1B, 48 saat süreyle hispidulinin değişen konsantrasyonlarında RA-6013 hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini göstermektedir. 12,5–100 μM hispidulinin RA-6013 hücreleri üzerinde canlılık açısından ciddi bir etkiye sahip olmadığı görüldü. 48 saatlik süre sonunda, 12,5–100 μM konsantrasyon aralığında hispidulin uygulanan sıçan primer akciğer fibroblast hücrelerinin canlılığı sırasıyla %75,03, %68,17, %64,97 ve %57,48 olarak belirlendi. 200, 400 ve 800 μM olmak üzere artan hispidulin konsantrasyonlarına maruz kalan fibroblastlarda hücre canlılığı ise sırasıyla %45,78, %24,85 ve %21,64 olarak bulundu. Diğer taraftan bu hücre hattında aynı süreyle H_2O_2 (500 μM)'le maruziyet, RA-6013 hücre canlılığını oldukça azaltarak %5,09'a

düşürdü.

Son olarak, hispidulinin RA-6217 hücreleri üzerindeki etkileri Şekil 1C'de görülebilir. MRC-5 hücre hattı durumunda olduğu gibi 48 saat boyunca 12,5–200 μM hispidulin tedavisinden sonra RA-6217 hücre canlılığı %50'nin altına düşmedi. 200 μM 'ye kadar olan tüm hispidulin konsantrasyonları, ilgili kontrol ile karşılaştırıldığında, primer trake fibroblast hücre canlılığını, artan konsantrasyonlarda önemli olmayan seviyelerle azalttı. Diğer taraftan 400 ve 800 μM olan yüksek hispidulin konsantrasyonlarıyla 48 saatlik tedaviden sonra hücre canlılığı yüzdesi %48,26 ve %37,38 olarak belirlendi. Ayrıca RA-6217 hücre hattının H_2O_2 (500 μM) ile maruziyeti sonucu hücre canlılığının %3,361 olduğu görüldü. Genel olarak hispidulinin, doza bağlı bir şekilde hücre ölüm oranını arttırdığı ve yüksek dozlarda hücre hatları üzerinde daha ciddi bir etkiye sahip olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar, MRC-5 ve RA-6217 hücre hatlarının 200 μM konsantrasyonunda hispiduline RA-6013'den daha dirençli olduklarını gösterdi.

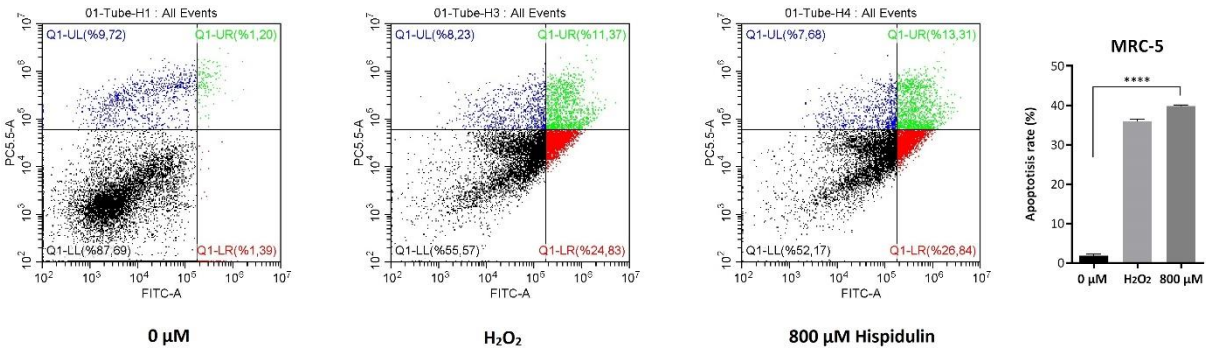


Şekil 1. 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda hispidulin muamelesinin İnsan akciğer fibroblastı (A; MRC-5), Sıçan Primer Akciğer Fibroblastı (B; RA-6013) ve Sıçan Primer Trakeal Fibroblastı (C; RA-6217) hücre hatlarında hücre canlılığı üzerindeki etkileri. Sonuçlar, herhangi bir madde kullanılmamış olan kontrol grubuna göre hesaplanan hücre canlılığı yüzdesi olarak sunulmuştur. Hata çubukları, tekrarlanan üç deneyin ortalamasının standart hatasına karşılık gelir. **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001

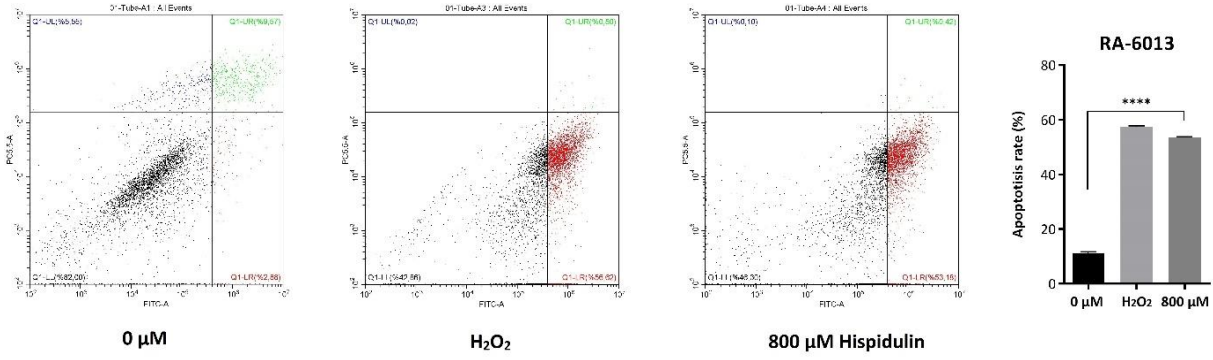
3.2. RA-6013, RA-6217 ve MRC-5 Hücrelerinde Hispidulin Kaynaklı Ölüm Tiplerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, sağlıklı insan akciğer hücreleri ile sağlıklı sıçan akciğer ve trake hücrelerinde hispidulin flavonunun etkisiyle meydana gelen baskın ölüm tipi karakterize edildi. Bu amaçla canlı, erken/geç apoptotik

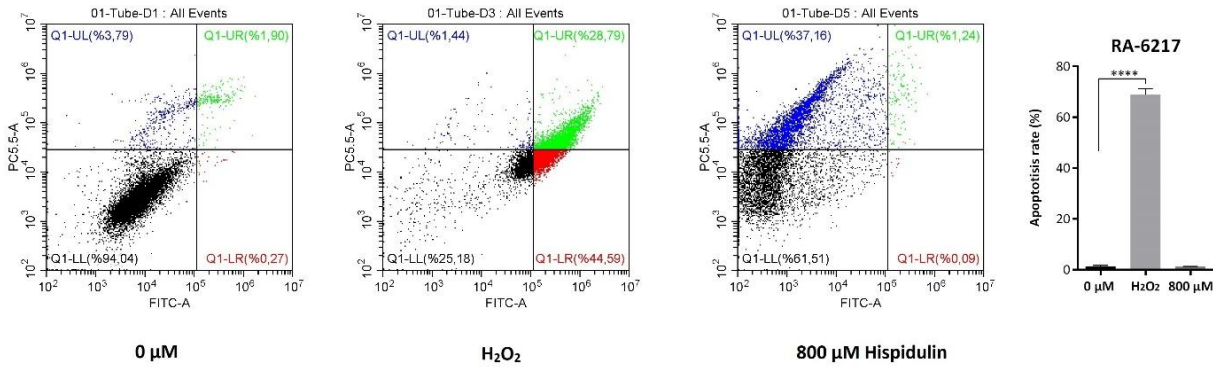
ve nekrotik hücre yüzdeleri ölçmek için Annexin V/PI çift boyama metodu kullanıldı. 48 saat boyunca 500 μM H_2O_2 (pozitif kontrol), 0 (kontrol) ve 800 μM (en yüksek konsantrasyon) hispiduline maruz bırakılan MRC-5, RA-6013 ve RA-6217 hücrelerinin akım sitometrik çizelgeleri, Şekil 2, 3 ve 4'te gösterildi.



Şekil 2. İnsan akciğer fibroblastı (MRC-5) hücrelerinde 48 saat boyunca 800 μM hispidulinle tedaviden sonra canlı, erken, geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının dağılımı. H_2O_2 (500 μM); pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ****p < 0,0001.



Şekil 3. Sıçan Primer Akciğer Fibroblastı (RA-6013) hücrelerinde 48 saat boyunca 800 μM hispidulinle tedaviden sonra canlı, erken, geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının dağılımı. H₂O₂ (500 μM); pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ****P<0,0001.



Şekil 4. Sıçan Primer Trakeal Fibroblastı (RA-6217) hücrelerinde 48 saat boyunca 800 μM hispidulinle tedaviden sonra canlı, erken, geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonlarının dağılımı. H₂O₂ (500 μM); pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. ****P<0,0001.

Söz konusu bu hücrelerin akım sitometri analizinin sonucu, 800 μM konsantrasyonunda hispidulinle muamelesinde hücrelerin canlıdan apoptotik duruma geçme eğiliminde olduğunu gösterdi. 48 saat süreyle 800 μM hispidulin uygulamasının kontrole göre MRC-5 hücrelerinde apoptotik olduğu bulundu (Şekil 2). 800 μM konsantrasyonunda hispidulin, MRC-5 hücrelerinde %40,15 oranında apoptoza neden olurken, kontrol hücrelerinde %2,59 oranında apoptotik hücre ölümüne yol açtı. Bununla birlikte 500 μM H₂O₂, MRC-5 hücrelerinde %36,60 oranında apoptoza indükledi.

Hispidulinin 800 μM konsantrasyonu, 48 saat sonra RA-6013 hücrelerinde ağırlıklı olarak apoptotik ölüme neden oldu (Şekil 3). RA-6013 hücreleri için apoptotik hücre yüzdeleri hispidulin 800 μM konsantrasyonunda %53,36, kontrolde %12,14 olarak bulundu. Öte yandan, aynı hücre hattında pozitif kontrol olarak kullanılan 500 μM H₂O₂'de ise apoptotik hücre yüzdesi %57,12 olarak gözlemlendi. 800 μM hispidulin uygulamasının kontrole göre RA-6217 hücrelerinde de nekrotik olduğu bulundu (Şekil 4). 800 μM konsantrasyonunda hispidulin RA-6217 hücrelerinde %37,16 oranında nekroza ve %1,33 oranında apoptoza neden olurken, kontrol hücrelerinde bu oranlar sırasıyla %3,79 ve %2,17 olarak belirlendi. Dahası 500 μM H₂O₂, RA-6217 hücrelerinde %73,38 oranında apoptoza neden oldu. Aslında, 800 μM konsantrasyonundaki hispidulin, RA-6217 hücrelerinde

indüklenenlerden istatistiksel olarak daha güçlü bir şekilde MRC-5 ve RA-6013 hücrelerinde erken ve geç apoptoza indükledi.

4. Tartışma

Yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma, potansiyel bir antikanser ilaç olarak hispidulinin hücre proliferasyonunu, apoptoza, hücre döngüsünü, anjiyogenezi ve metastazı etkilediğini göstermiştir. Ayrıca hispidulinin klinikte yaygın olarak kullanılmakta olan bazı antikanser ilaçlarla birlikte kullanıldığında bu ilaçların hassasiyetini artırarak sinerjistik anti-tümör etkiler sergilediği belirtilmiştir. Mevcut literatüre dayanarak, hispidulinin kanserin önlenmesi ve tedavisi için önemli bir tamamlayıcı ilaç olma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır (Liu ve ark., 2020). Bunun yanı sıra hispidulin, oral yolla alındıktan sonra %4,02'lik mutlak biyoyararlanım ile mide ve bağırsaklarda hızla emildiği ifade edilmektedir (Cong ve ark., 2016). Ancak bu flavonun farmakokinetiği ve organlarda biyobirikimi, spesifik hücresel hedeflerin olmaması ve toksikolojik güvenliği hakkında sınırlı veri vardır. Bu nedenle, bahsi geçen sorunların ele alınması ve klinik uygulamada kemoprevensiyon ve kemoterapide kullanımı için hispidulin ve hispidulin türevli bileşiklerin güvenliğini garantileme konusunda araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, hispidulinin geniş konsantrasyon aralığında sağlıklı MRC-5, RA-6013 ve RA-6217 hücre hatları üzerindeki güvenilirliği MTT ve Akım sitometri analizleriyle değerlendirildi. MTT analiziyle elde edilen bulgulara göre; hispidulinin uygulanan dozlarından yalnızca en yüksek seviyede olanları, sağlıklı MRC-5, RA-6013 ve RA-6217 hücrelerin canlılığını %50 oranında azaltmaya başlattı. Bununla birlikte hesaplanan %50 inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerinin, MRC-5 hücreleri için 563.63 μ M, RA-6013 hücrelerinde 194.30 μ M ve RA-6217 hücrelerinde ise 311.98 μ M olduğu bulundu. Sonuçlarımıza göre 48 saat boyunca 200 μ M'a kadar olan dozların uygulandığı sağlıklı hücreler, en umut verici canlılık profiline sahipti. Kanserle ilgili yapılan *in vitro* çalışmalarda kullanılan hispidulin dozları, mevcut çalışmamızdakinden daha düşük seviyede olmasına rağmen, kanserli hücreler üzerinde güçlü sitotoksik etki sergilediği görülmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, hispidulinin, insan nazofaringeal karsinom (CNE-2Z) hücrelerinde proliferasyon, invazyon, migrasyon ve apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmış ve MTT analiziyle CNE-2Z hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır. Çalışmada ayrıca hispidulinin 25, 50 ve 100 μ M dozlarında CNE-2Z hücrelerinde doza bağlı bir şekilde apoptozu indüklediği akım sitometrisiyle tespit edilmiş ve apoptoz oranının sırasıyla %13,3, %17,1 ve %24,6, kontrol hücrelerinininkinin ise %5,3 olduğu gösterilmiştir (Dai ve ark., 2021). Diğer bir çalışmada, 2,5-160 μ M'a kadar değişen çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan hispidulinin, meme kanseri (MCF-7 ve HCC38) hücrelerinde IC_{50} değerlerinin 25,44 μ M ve 65,42 μ M olduğu tespit edilmiştir (Kim and Lee, 2021). Başka bir önemli çalışmanın analizlerinde, insan hepatosellüler karsinom (SMMC7721 ve Bel7402) hücreleri üzerine 10 ve 20 μ M dozlarındaki hispidulinin, hücre büyümesini inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği ortaya çıkmıştır (Han ve ark., 2018). Hispidulinin daha düşük konsantrasyonlarının (0, 4, 8, 15, 30 ve 60 μ M) çalışıldığı farklı bir çalışmada, 24 ve 48 saat boyunca hispidulin tedavisinin insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatlarında (NCI-H460 ve A549), hücre canlılığını zamana ve konsantrasyona bağlı olarak belirgin bir şekilde azalttığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada, akım sitometriyle de 15 ve 30 μ M dozlarında hispidulinle tedavinin apoptotik hücrelerin yüzdesinde önemli bir artışa yol açtığı görülmüştür (Lv ve ark., 2020). Bir diğer çalışmada ise 48 saat boyunca 10 ve 50 μ M dozlarında hispidulin muamelesinin, insan prostat kanseri (Du145 ve VCaP) hücrelerinde apoptozu hızlandırdığı, akım sitometrisi analiziyle rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2021). Bu çalışmalarda belirtilen hispidulinin etkin dozlarının aksine mevcut çalışmamızda, akım sitometrisi analizine göre hispidulinin 800 μ M dozunda sağlıklı hücrelerde benzer apoptotik seviyelere erişildiği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, H_2O_2 (500 μ M) ile karşılaştırıldığında hispidulinin, tümör olmayan hücrelerde yakın bir güvenlik profiline sahip olduğu belirlenmiştir. Kanserli hücrelerin dışında yapılan bir *in vitro* çalışmada,

hispidulinin 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında önemli bir sitotoksositeye neden olmadan, insan $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositlerinde erken aktivasyon üzerine inhibitör etkisi oluşturduğu kanıtlanmıştır (Thitilertdecha ve ark., 2022). Benzer bir çalışmada, hispidulinin, inflamasyonla ilişkili hastalıklar için uygun immüno-supresan olarak hücre ölümüne neden olmadan, erken T-hücresi aktivasyonunun 200 μ M'a kadar doza bağlı inhibitör aktivitesini sergilediği tespit edilmiştir (Thitilertdecha ve ark., 2019).

5. Sonuç

Literatürde konuyla ilgili gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarından da anlaşıldığı üzere, hispidulinle ilgili *in vitro* çalışmalarda kullanılan düşük dozların bile, kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkisi varken, aynı dozlarda sağlıklı hücrelerde herhangi bir zararı söz konusu değildir. Bu araştırma, daha önceki çalışmalarda kullanılan hispidulin dozunun çok üstündeki doz seviyeleri (0-800 μ M) ilk defa denenmiş olması açısından, literatüre hispidulinin güvenli kullanımına yönelik önemli katkılar sağlamaktadır.

Mevcut verilerimiz, hispidulinin sağlıklı akciğer ve trake hücrelerinin çoğalmasında üzerindeki inhibe edici etkisinin çok yüksek dozlarla ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır. Hispidulinin, solunum yolu hastalıklarının tedavisi için güvenilir doğal bir bileşik olma potansiyeline sahip olduğu ve çeşitli kanser tiplerinin gelecekteki tedavisi için ayrıcalıklı bir terapötik ajan haline gelebileceği düşünülmüştür.

Katkı Oranı Beyanı

Yazar katkı yüzdesi aşağıda verilmiştir. Yazar makaleyi incelemiş ve onaylamıştır.

	F.A.
K	100
T	100
Y	100
VTI	100
VAY	100
KT	100
YZ	100
KI	100
GR	100
PY	100
FA	100

K= kavram, T= tasarım, Y= yönetim, VTI= veri toplama ve/veya işleme, VAY= veri analizi ve/veya yorumlama, KT= kaynak tarama, YZ= Yazım, KI= kritik inceleme, GR= gönderim ve revizyon, PY= proje yönetimi, FA= fon alımı.

Çalışma Beyanı

Yazar bu çalışmada hiçbir çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmektedir.

Etik Onay Beyanı

Bu araştırmada hayvanlar ve insanlar üzerinde herhangi bir çalışma yapılmadığı için etik kurul onayı alınmamıştır.

Destek ve Teşekkür Beyanı

Yazar sağladığı imkanlardan dolayı Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (DAYTAM)'ne teşekkür etmektedir.

Kaynaklar

An P, Wu T, Yu H, Fang K, Ren Z, Tang M. 2018. Hispidulin protects against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *J Mol Neurosci*, 65(2): 203-212.

Ashaq, A., Maqbool, M. F., Maryam, A., Khan, M., Shakir, H. A., Irfan, M., Qazi JI, Li Y, Ma, T. 2021. Hispidulin: A novel natural compound with therapeutic potential against human cancers. *Phytother Res*, 35(2): 771-789.

Cong Y, Wu S, Han J, Chen J, Liu H, Sun Q, Wu Y, Fang, Y. (2016). Pharmacokinetics of homoplantagin in rats following intravenous, peritoneal injection and oral administration. *J Pharm Biomed Anal*, 129: 405-409.

Dai, Y., Sun, X., Li, B., Ma, H., Wu, P., Zhang, Y., Zhu M, Li HM, Qin M., Wu, C.Z. 2021. The Effect of Hispidulin, a Flavonoid from *Salvia plebeia*, on Human Nasopharyngeal Carcinoma CNE-2Z Cell Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis. *Molecules*, 26(6): 1604.

Gao H, Jiang Q, Han Y, Peng J, Wang C. 2015. Hispidulin potentiates the antitumor effect of sunitinib against human renal cell carcinoma in laboratory models. *Cell Biochem Biophys*, 71(2): 757-764.

Han M, Gao H, Ju P, Gao MQ, Yuan YP, Chen XH, Liu K, Han Y, Han, ZW. 2018. Hispidulin inhibits hepatocellular carcinoma growth and metastasis through AMPK and ERK signaling mediated activation of PPAR γ . *Biomed Pharmacother*, 103: 272-283.

Huang L, Huang K, Ning H. 2018. Hispidulin prevents sevoflurane—Induced memory dysfunction in aged rats. *Biomed Pharmacother*, 97: 412-422.

Kaufman PB, Csake LJ, Warber S, Duke JA, Brielmann HL. 1998. *Natural products from plants*, CRC Press, Boca Raton.

Kavakcıoğlu Yardımcı B, Geyikoglu F, Aysin F, Koc K, Simsek Ozek N, Küçükataş V. 2021. The cytotoxic and apoptotic effects of beta-blockers with different selectivity on cancerous and healthy lung cell lines. *Mol Biol Rep* 48(5): 4009-4019.

Kim HA, Lee J. 2021. Hispidulin modulates

epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Oncol. Lett*, 21(2): 1-1.

Lin FJ, Yen FL, Chen PC, Wang MC, Lin CN, Lee CW, Ko HH. 2014. HPLC-fingerprints and antioxidant constituents of *Phylla nodiflora*, *Sci. World J*. 2014.

Lin SR, Fu YS, Tsai MJ, Cheg H, Weng CF. 2017. Natural compounds from herbs that can potentially execute as autophagy inducers for cancer therapy. *Int J Mol Sci*, 18:1412.

Lin TY, Lu CW, Wang CC, Lu JF, Wang SJ. 2012. Hispidulin inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 263(2): 233-243.

Liu K, Zhao F, Yan J, Xia Z, Jiang D, Ma P. 2020. Hispidulin: A promising flavonoid with diverse anti-cancer properties. *Life Sci*, 259: 118395.

Lv L, Zhang W, Li T, Jiang L, Lu X, Lin J. 2020. Hispidulin exhibits potent anticancer activity in vitro and in vivo through activating ER stress in non-small-cell lung cancer cells. *Oncol Reports*, 43(6): 1995-2003.

Mocan A, Vodnar DC, Vlase L, Crişan O, Gheldiu AM, Crişan G. 2015. Phytochemical characterization of *Veronica officinalis L.*, *V. teucrium L.* and *V. orchidea Crantz* from Romania and their antioxidant and antimicrobial properties. *Int J Mol Sci*, 16(9): 21109-21127.

Patel, K., Patel, DK. 2017. Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report. *J Tradit Complement Med*, 7(3): 360-366.

Thitilertdech P, Tantithavorn V, Pongpairaj P, Onlamoon N. 2019. Determination of suppressive effect on human T-cell activation by hispidulin, nepetin, and vanillic acid. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 41(6): 591-598.

Thitilertdech P, Tantithavorn, V, Pongpairaj P, Onlamoon N. 2022. Synergistic immunosuppressive effect of hispidulin and nepetin mixtures on human T lymphocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 44(5): 693-703.

Wang Y, Guo S, Jia Y, Yu X, Mou R, Li X. 2021. Hispidulin inhibits proliferation, migration, and invasion by promoting autophagy via regulation of PPAR γ activation in prostate cancer cells and xenograft models. *Biosci Biotechnol Biochem*, 85(4): 786-797.

Wilcox EC, Edelman ER. 2022. Substratum interactions modulate interplay between endothelial cell, epithelial cell, and fibroblast phenotype and immunomodulatory function. *Biomaterials*, 289: 121785.

Yu CY, Su KY, Lee PL, Jhan JY, Tsao PH, Chan DC, Chen YLS. 2013. Potential therapeutic role of hispidulin in gastric cancer through induction of apoptosis via NAG-1 signaling. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2013.