

Psephellus pyrrhoblepharus Ekstrelerinin Sitotoksik Aktivitesi

Potential Cytotoxic Activity of *Psephellus pyrrhoblepharus* Extracts

Pelin TAŞTAN¹, Güliz ARMAĞAN², Taner DAĞCI³, Bijen KIVÇAK¹

¹ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Özet

Amaç: Birçok *Psephellus* ve *Centaurea* türü antipiretik, antiinflamatuvar, diüretik ve sitotoksik gibi önemli farmakolojik aktivitelere sahiptir. Son günlerde kanserde terapötik amaçlar için bitki kaynaklı bileşiklerin kullanımına olan ilgi artmaktadır. Karaciğer kanseri tüm dünyada milyonlarca insanı etkilemektedir. Bu nedenle tedavi için ortaya konan herhangi bir yaklaşım son derece değerlidir. Bu çalışmada, insan karaciğer kanseri hücre (HepG2) kullanılarak *P. pyrrhoblepharus* bitkisinin topraküstü kısımlarından hazırlanmış olan metanol:su (1:1), kloroform ve n-hekzan ekstrelerinin sitotoksik potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Endemik bir bitki olan *Psephellus pyrrhoblepharus* (Boiss.) Wagenitz, Elazığ, Türkiye'den toplanarak ekstreler hazırlanmıştır. Ekstreler farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200 µg/ml) farklı zaman noktalarında (6, 12, 24 s) insan karaciğer kanser hücre hatlarına (HepG2) uygulanmış ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromit (MTT) metodu kullanılarak hücre canlılığındaki değişim ölçülmüştür.

Bulgular: Sitotoksikite ile ilgili olarak, farklı zaman noktalarında ekstrelerin maruziyetlerinin ardından hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, en yüksek sitotoksik aktivite, 24 saatte 100 µg/mL konsantrasyondaki kloroform ekstresinde gözlenmiştir (p<0.05). Bitkinin kloroform ekstresi, metanol:su ve n-hekzan ekstreleri ile karşılaştırıldığında 12 saatte 200 µg/ml konsantrasyonda en yüksek sitotoksik etkinliği göstermiştir (p<0.05).

Sonuç: *P. pyrrhoblepharus* ekstrelerinin HepG2 karsinoma hücrelerinde doza ve zamana bağlı bir şekilde sitotoksik etki gösterdiği ileri sürülebilir. Genel olarak elde edilen sonuçlar, toksisite tehlikesi olmadan farklı uygulamalarda kullanılabilir *P. pyrrhoblepharus* ekstrelerinin eşik konsantrasyonları hakkında bilgi sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: *Psephellus pyrrhoblepharus*, Sitotoksik aktivite, HepG2, MTT

Abstract

Objective: In *Psephellus* and *Centaurea* genres, various species have important pharmacological activities like antipyretic, anti-inflammatory, diuretic, cytotoxic etc. The interest in use of plant-derived compounds for therapeutic purposes in cancer is increasing day by day. Liver cancer affects millions of people all over the world. So, any therapeutic approach to treat liver cancer is extremely valuable. In this study, it was aimed to evaluate the cytotoxic potential of methanol: water (1: 1), chloroform and n-hexane extracts prepared from the aerial parts of *P. pyrrhoblepharus* plant using human liver cancer cells (HepG2).

Materials and Methods: The endemic plant *Psephellus pyrrhoblepharus* (Boiss.) Wagenitz (*Centaurea pyrrhoblephara*) was collected from Elazığ, Turkey and extracts were prepared. Human liver cancer cell (HepG2) were treated by different concentrations (50, 100, 200 µg/mL) of extracts at different time points (6, 12 and 24 h) and the changes in cell viability were measured by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay.

Results: Regarding the cytotoxicity, cell viability was observed to decrease following extract exposures at three different time points. The highest cytotoxic activity was found at 100 µg/mL concentrations of chloroform extract at 24 h (p<0.05). At 12 h, chloroform extract of plant showed the highest cytotoxic activity at 200 µg/mL concentrations when compared to methanol:water and n-hexane extracts.

Conclusion: It can be suggested that extracts of *P. pyrrhoblepharus* show dose-dependent and time-dependent cytotoxic effects in HepG2 carcinoma cells. In general, the results provide information about the threshold concentrations of *P. pyrrhoblepharus* extracts that might be used in different applications without the risk of toxicity.

Keywords: *Psephellus pyrrhoblepharus*, Cytotoxic activity, HepG2, MTT

Yazışma adresi:

Pelin TAŞTAN, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Telefon: +905339637417, Mail: pelintastan35@gmail.com

ORCID No (Sırasıyla): 0000-0003-0913-5369, 0000-0001-6466-2263, 0000-0002-2786-6141, 0000-0001-7645-1930

Geliş Tarihi: 31.08.2020

Kabul Tarihi: 23.12.2020

DOI: 10.17517/ksutfd.788445

GİRİŞ

Asteraceae familyasında yer alan *Psephellus* ve *Centaurea* cinslerine ait türlerin birçok farmakolojik aktiviteye sahip olduğu yapılmış olan çalışmalarla gösterilmiştir (1-10). Bunlar içerisinde en çok bilinenler antiinflamatuvar, antipiretik, sitotoksik, diüretik, ekspektoran, antidiyabetik ve emmenagog şeklindedir. *Psephellus pyrrhoblepharus* bitkisi, daha önce *Centaurea* generu içerisinde incelenmiş olmakla birlikte morfolojik, anatomik, karyolojik ve palinolojik incelemeler sonucunda *Psephellus* generu içerisine alınmış olan 12 *Centaurea* türünden biri olmuştur. Halk arasında *Psephellus* generu 'tülübaş' adı ile bilinmektedir. Bu bitkinin sinonim isimleri *Aetheopappus pyrrhoblepharus* (Boiss.) Sosn. ve *Centaurea pyrrhoblephara* (Boiss.)'dır. Bu çalışma için Elazığ bölgesinden toplanmış olan *P. pyrrhoblepharus* türü, endemik olup Türkiye'de Orta ve Doğu Karadeniz bölgeleri, Yukarı Kızılırmak bölgesi, YukarıFırat bölgesi ve Erzurum ve Kars bölgelerinde yayılım göstermektedir (11,12). Elazığ yöresinde yapılmış olan etnobotanik çalışmalarda ve kaynaklardan elde edilmiş olan bilgiler ışığında, *Psephellus pyrrhoblepharus* (Boiss.) Wagenitz bitkisinin yöre halkı tarafından 'deli tülübaş' adı ile bilindiği öğrenilmiştir (13). *P. pyrrhoblepharus* bitkisinin geleneksel kullanımına dair herhangi bir çalışma bulunmasa da, aynı cinse ait *Psephellus appendicigerus*, *Psephellus erzincanii* ve *Psephellus karduchorum* bitkilerini de içeren birçok türün yara iyileştirici olarak ve abse tedavisinde kullanıldığı yapılan çalışmalarla desteklenmiştir (10, 14). Bu da, çalışmamızda seçilen bitkinin potansiyel olarak terapötik etkiye sahip olabileme ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

Kanser, yaklaşık 14 milyon yeni vaka ve 8 milyon ölümler birlikte morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Türkiye'de ölüm sebepleri arasında iskemik kalp hastalıkları sonrasında 2. sırada yer almaktadır. Karaciğer kanseri tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyen önemli bir kanser türüdür. Uluslararası kanser çalışmaları ve istatistikleri üzerine bilgi veren Dünya Sağlık Örgütü kaynaklı Globocan 2012 verilerine göre, dünyada erkeklerde en sık görülen 5. kanser türü olarak gösterilmiştir (15). Son zamanlarda kansere karşı terapötik amaçlar için bitkisel kaynaklı bileşiklerin kullanımına olan ilgi gitgide artmaktadır. Bu sebeple, karaciğer kanserini tedavi etmek için herhangi bir yaklaşımın önemi oldukça büyüktür. Bu çalışmanın amacı, *Psephellus pyrrhoblepharus* (Boiss.) Wagenitz bitkisine ait farklı ekstraktların karaciğer kanseri hücrelerinde doza bağlı yanıtını karşılaştırmaktır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bitkisel Materyal

Psephellus pyrrhoblepharus bitkisi, Elazığ ili Harput ilçesi Buzluk Mağarası kuzey yamaçlarında, kayalıklardan (1500 m kadar yükseklikten) 2016 Mayıs-Haziran aylarında, bitki çiçekli halde iken toplanmıştır. Bitkinin teşhisi Doç.Dr. Uğur Çakılcıoğlu tarafından gerçekleştirilmiştir. Bitkiye ait herbaryum örnekleri ise Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognosi Anabilim Dalı Herbaryumunda 1464 numaralı her-

baryum olarak saklanmaktadır. Bitkinin toprak üstü kısımları safsızlık ve kirliliklerinden arındırılıp küçük parçalara bölünmüş ve kurutulmuştur. Bu kısımlar metanol ile perkol edilmiştir. Seryum sülfat ile ince tabaka kromatografisinde verdiği renklerin kontrolüne göre perkolasyona son verilmiştir. Elde edilen metanol ekstresi metanol:su (1:1) ile muamele edilmiş ve sonrasında sırasıyla n-hekzan ve kloroform ile ekstre edilmiştir. Aynı ayrı düşük vakumda çözücülerinden arındırıldıktan sonra metanol:su, n-hekzan ve kloroform ekstraktlarının eldesi gerçekleştirilmiştir (16,17).

Hücre Kültürü Yöntemi

Bu çalışma için insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 (ATCC, #CRL-2266) kullanılmıştır. Çalışma süresince hücreler %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin ve streptomisin içeren besi yeri (DMEM) kullanılarak hücre kültür kaplarına ekilip %5 CO₂ ve 37°C'de inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Hücreler istenen oranda çoğaldıktan sonra tripsin (%0.25) yardımı ile flasklardan kaldırılarak santrifüj edilmiş, daha sonra 1:1 oranında hücre süspansiyonu ve %0.4 tripan mavisi solüsyonu ile karıştırılmıştır. Neubauer lamına yerleştirilerek 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletilerek invert mikroskopta sayılmıştır. Yöntem için gereken hücre sayısını içeren miktarlarda (5x10³ hücre/kuyucuk) 96-kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiştir. Üç farklı konsantrasyonda (50, 100, 200 µg/mL) ekstre 6, 12 ve 24 saat olmak üzere üç farklı sürede hücreler ile muamele edilmiştir. Ardından hücre canlılığı analizi yapılmıştır.

Hücre canlılığı analizi

Ekstre uygulamalarının sonunda her bir kuyucuğa 20 mL (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid) tetrazolium (MTT) çözeltisi (5 mg/ml, fosfat tamponu içinde) eklenmiştir. Üç saat süre ile %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin üzerinden çözelti uzaklaştırılarak kuyucuklara 100'er µl DMSO eklenmiştir. MTT ile oluşan formazan kristallerini çözmek için 10 dakika 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe bekletilmiştir. Mikroplaka okuyucu (Multiskan Go, Thermo Scientific) ile her bir kuyucuk 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Okunan absorbans değerine göre hücre canlılığı % değişim olarak hesaplanmıştır. Referans dalga boyu olarak 650 nm kullanılmıştır.

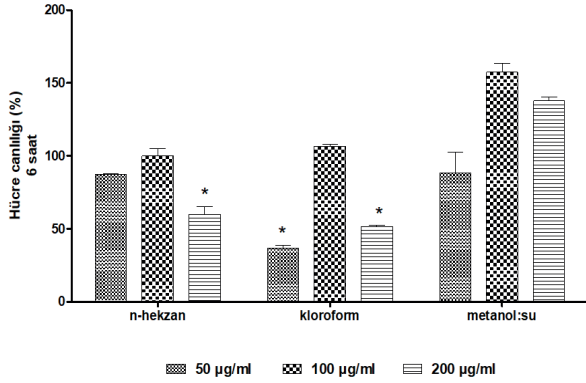
Bu makale, etik kurul kararı alınmasını gerektirecek çalışma içermemektedir

İstatistiksel Analiz

P. pyrrhoblepharus bitkisinden hareketle hazırlanmış olan n-hekzan, kloroform ve metanol:su ekstraktlarını kapsayan deney gruplarında tüm örnekler en az beş kez çalışılmıştır. Sayısal değerlendirmelerde ortalama değerler ve standart sapmalar rapor edilmiştir. Deney grupları arasındaki istatistiksel farklar ANOVA (analysis of variance) yöntemi ile %95 güven aralığında değerlendirilmiş, gruplar arasındaki ilişkiler Tukey's post-hoc yöntemiyle saptanmıştır. Kontrol grubu olarak ekstre ile muamele edilmemiş hücre grupları kullanılmıştır.

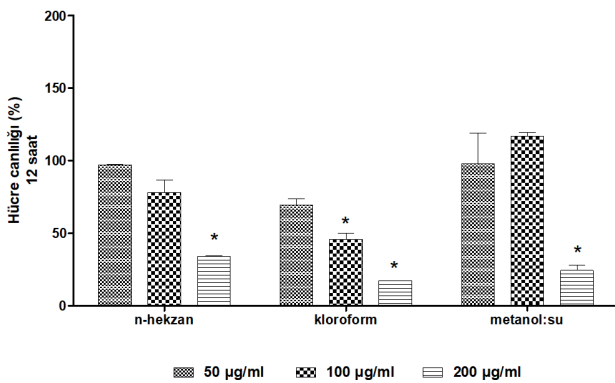
BULGULAR

Hücre proliferasyonu ve sitotoksitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan tuzlardan biri MTT'dir (18). Hazırlanan ekstrelerin insan karaciğer karsinoma hücre canlılığına etkisini değerlendirmek için söz konusu yöntemden yararlanılmıştır. Farklı solvanlar kullanılarak hazırlanan *Psephellus pyrrhoblepharus* (Boiss.) Wagenitz bitki ekstralarının hücre canlılığındaki değişim üzerine etkileri ölçüldüğünde konsantrasyona ve süreye bağlı olarak yanıtların farklılık gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 1-3).



Şekil 1. Altı saat süre ile üç farklı konsantrasyonda (50, 100, 200 µg/mL) uygulanan ekstraların HEPG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi. *p<0.05 vs. kontrol grubu

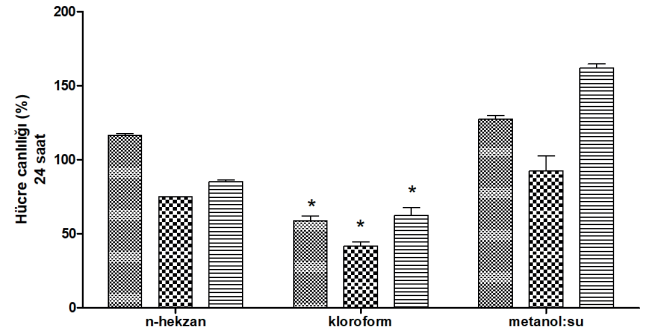
Karaciğer karsinoma hücre hattına altı saatlik uygulamanın ardından, özellikle yüksek konsantrasyondaki n-hekzan ve kloroform ekstraları hücre canlılığını kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azaltmıştır (p<0.05) (n-hekzan ekstresi (200 µg/mL) % 60.03 ± 7.21; kloroform ekstresi (200 µg/mL) %51.42 ± 1.26). Oniki saatlik uygulama karşılaştırıldığında her üç ekstrenin de doza bağlı olarak hücre canlılığını etkilediği tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. On iki saat süre ile üç farklı konsantrasyonda (50, 100, 200 µg/mL) uygulanan ekstraların HEPG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi. *p<0.05 vs. kontrol grubu

Yirmidört saatlik uygulama sonucunda doza bağlı etkinin ortadan kalktığı fakat diğer taraftan, özellikle kloroform

ekstresinin anlamlı düzeyde ve seçilen konsantrasyonlarda etkin olduğu tespit edilmiştir (p<0.05, Şekil 3).



Şekil 3. Yirmi dört saat süre ile üç farklı konsantrasyonda (50, 100, 200 µg/mL) uygulanan ekstraların HEPG2 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine etkisi. *p<0.05 vs. kontrol grubu

En yüksek sitotoksik aktivitenin, 24 saat uygulama sonrası 100 µg/mL konsantrasyondaki kloroform ekstresinde gerçekleştiği görülmektedir (hücre canlılığı kontrol grubu: % 100.09 ± 0.87; kloroform (100 µg/mL) % 39.45 ± 3.43). Artan maruziyet süresine bağlı olarak metanol:su ekstresinin sitotoksik etkinlik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, Şekil 2'de görüldüğü üzere bitkinin kloroform ekstresinin, metanol:su ve n-hekzan ekstraları ile karşılaştırıldığında en yüksek sitotoksik etkinliği 12 saatte ve 200 µg/mL konsantrasyonda gösterdiği görülmüştür (%17.13 ± 0.28).

TARTIŞMA

Dünya çapında yaygın olarak uygulanan geleneksel tıp, bitkilerin antitümör, antioksidan ve antimikrobiyal bileşiklerin önemli ve güvenilir bir kaynağı olduğunu göstermektedir. Geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin çeşitli biyolojik aktiviteler açısından değerlendirilmesi, biyoaktif bileşenlerin izole edilmesi ve karakterizasyonu yeni ilaç geliştirilmesine öncülük etmektedir. Kanser tedavisi için kullanılan kemoterapötik ilaçların çoğu hücre bölünmesini inhibe ederek ve hızlı bölünen hücreleri seçici olarak hedefleyerek çalışmaktadır. Bununla birlikte, birçok antikanser ajanın yan etkileri ve ajan karşı gelişen direnç ciddi sorunlar haline gelmiştir (19). Bu nedenle, özellikle doğal kaynaklı bileşiklerden kanser tedavisi için güvenli ve daha etkili terapötik ajanlar geliştirme yönünde ihtiyaç gün geçtikçe artmaktadır.

HepG2 hücre hattı kullanılarak başka *Centaurea* türlerinden hareketle hazırlanmış olan ekstraların sitotoksik aktivitelerine ait çalışmalar incelendiğinde, birçok türün de sitotoksik aktivitesinin bulunduğu görülmüştür (20-22). Aynı hücre hattında *P. pyrrhoblepharus* toprak üstü kısımlarından hazırlanmış olan ekstralarının sitotoksik aktiviteleri karşılaştırıldığında, en yüksek aktiviteyi kloroform ekstresinin gösterdiği tespit edilmiştir.

Gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışma sonucunda *P. pyrrhoblepharus* ekstralarının HepG2 karsinoma hücrelerinde

doza ve zamana bağlı bir şekilde sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, toksisite tehlikesi olmadan farklı uygulamalarda kullanılabilir üç ayrı *P. pyrrhoblepharus* ekstresinin eşik konsantrasyonları hakkında bilgi edinmemizi sağlamıştır. Her bir ekstre için; artan konsantrasyonun azalan hücre canlılığı ile ilişkisi 24 saatten daha kısa süreli uygulamalarda geçerli olmuştur. Özellikle hücrenin ekstreyle maruziyet süresinin sitotoksik etkilerin görülmesi açısından önemli olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca bu çalışma, *P. pyrrhoblepharus* ekstresinin HepG2 karsinoma hücrelerine karşı sitotoksik olduğunu ilk defa göstermiş olması bakımından da önem taşımaktadır. Bununla birlikte, bu ekstrelerin ve ihtiva ettikleri bileşiklerin tam potansiyelini anlamak için daha fazla in vitro ve in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır.

P. pyrrhoblepharus bitkisi ekstresinin hücre canlılığındaki değişim üzerine etkilerinin ölçülmesi sonucunda, konsantrasyona ve süreye bağlı olarak yanıtların farklılık gösterdiği gözlenmiştir. 6 saatlik, 12 saatlik ve 24 saatlik her bir uygulama sonucunda belirlenen konsantrasyonlarda HepG2 hücre hattına karşı en yüksek sitotoksik aktiviteyi kloroform ekstresinin gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum da, seçilen bitkinin sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu destekleyen bir deney sonucu olmuştur.

Yine tarafımızdan yapılmış başka bir çalışmada, nöroblastoma hücre hattı üzerinde *P. pyrrhoblepharus* kloroform, n-hekzan ve metanol:su ekstresinin seçilen konsantrasyonlarında toksik olmadığı tespit edilmiştir (23). Söz konusu çalışma *P. pyrrhoblepharus* bitkisinin beyin hücrelerinde nöroprotektif ve antioksidan potansiyelini destekler niteliktedir. Çalışmamız; seçilen bitki ile HepG2 hücre hattı kullanılarak yapılmış ilk çalışma olarak literature önemli bir katkı sağlamanın yanı sıra bitkilerle yapılan çalışmalarda farklı kanser tiplerinde farklı yanıtların saptanabileceğini göstermektedir.

Teşekkür

Bu çalışmada imkanlarından faydalanılan Ege Üniversitesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL)'na teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması Beyanı

Söz konusu çalışmada yer alan yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

1. Aktümsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food Chem Toxicol.* 2013; 55: 290-6.
2. Erel SB, Demirci B, Demir S, Karaalp C, Hüsnü Can Baser K. Composition of the essential oils of *Centaurea aphrodisia*, *C. polyclada*, *C. athoa*, *C. hyalolepis* and *C. iberica*. *J Essent Oil Res.* 2013; 25(2): 79-84.
3. Bakr RO, Mohamed SA, Ayoub N. PHENOLIC PROFILE OF *Centaurea aegyptiaca L.* growing in Egypt and its cytotoxic and antiviral activities. *African J Tradit Complement Altern Med* 2016; 13(6): 135-43.
4. Radan M, Carev I, Tesevic V, Politeo O, Culic VC. Qualitative HPLC-DAD/ESI-TOF-MS Analysis, Cytotoxic, and Apoptotic Effects of Croatian Endemic *Centaurea ragusina L.* Aqueous Extracts. *Chem Biodivers* 2017; 14(9).
5. Pirvu L, Dragomir C, Schiopu S, Mihul SC. Vegetal extracts with gastroprotective activity. Part. I. extracts obtained from *Centaurea cyanus L.* raw material. *Rom Biotechnol Lett.* 2012; 17(2): 7169-76.
6. Aktümsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea L.* species. *Food Chem Toxicol* 2013;55:290-6.
7. Pollock JL, Kogan LA, Thorpe AS, Holben WE. (±)-Catechin, A Root Exudate of the Invasive *Centaurea stoebe Lam.* (Spotted Knapweed) Exhibits Bacteriostatic Activity Against Multiple Soil Bacterial Populations. *J Chem Ecol* 2011;37(9):1044-53.
8. Gülcemal D, Alankuş-Çalışkan Ö, Karaalp C, Örs AU, Ballar P, Bedir E. Phenolic Glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei DC.* subsp. *urvillei*. *Carbohydr Res* 2010;345(17):2529-33.
9. Csupor D, Widowitz U, Blazsö G, Laczkö-Zöld E, Tatsimo JSN, Balogh Á, et al. Anti-inflammatory activities of eleven *centaurea* species occurring in the carpathian basin. *Phyther Res* 2013; 27(4).
10. Dalar A, Konczak I. Botanicals from Eastern Anatolia Region of Turkey: Antioxidant capacity and phenolic constituents of endemic herbal medicines. *J Herb Med.* 2012; 2(4): 126-35.
11. Negaresh K, Khoshroo SMR, Karamian R, Joharchi MR. A revision of *Rhaponticoides* (Asteraceae, Cardueae-Centaureinae) from Iran. *Phytotaxa* 2015; 213(2): 87.
12. Bona M. An Overview to *Centaurea s.l.* (Asteraceae) Based on Herbarium Specimens of ISTE. *J. Fac. Pharm. Istanbul* 2013; 43(2): 121-37.
13. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç M. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul; 2012.
14. Sagirolu M. An ethnobotanical survey from Hayrat (Trabzon) and Kalkandere (Rize/Turkey). *Biol Divers Conserv.* 2012; 5(1): 31-43.
15. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence, Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* 2016;388(10053):1545-1602.
16. Ashraf A, Sarfraz RA, Rashid MA, Shahid M. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. *J Food Drug Anal* 2015; 13: 109-15.
17. Rashid MA, Akhtar MN, Ashraf A, Nazir S, Ijaz A, Omar NA, Noor S, Basit A, Tareen RB. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Crambe cordifolia* roots. *Framacia* 2018; 66(1): 165-71.
18. Karikas GA. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. *Journal of BUON: official journal of the Balkan Union of Oncology* 2010;15(4):627-638.
19. Sonis ST. Oral mucositis. *Anticancer Drugs* 2011;22:607-12.
20. Sekerler T, Sen A, Bitis L, Sener A. Anticancer, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Chloroform Extracts from Some *Centaurea* Species. *Proceedings* 2018; 2: 1542.

21. Sary HG, Singab ANB, Orabi KY. New Cytotoxic Guaianolides from *Centaurea aegyptiaca*. *Natural Product Communications* 2016; 11(6): 711-14.
22. Manukyan A, Lumlerdkij N, Heinrich M. Caucasian endemic medicinal and nutraceutical plants: in-vitro antioxidant and cytotoxic activities and bioactive compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2019; 71(7): 1152-61.
23. Tastan P, Armagan G, Dagci T, Kivcak B. Evaluation of cell protection by *Psephellus pyrrhoblepharus* (Boiss.) Wagenitz extracts in MPP⁺-induced dopaminergic cell damage. *Drug and Chemical Toxicology* 2019. Sep 2:1-7.