








***PTILOSTEMON CHAMAEPEUCE* (L.) LESS.'İN SİTOTOKSİK VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ**

*CYTOTOXIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF PTILOSTEMON CHAMAEPEUCE
(L.) LESS.*

Serdar DEMİR^{1*} , Yalçın ERZURUMLU² , İsmail ÖZTÜRK³ , Petek BALLAR
KIRMIZIBAYRAK⁴ , Canan KARAALP¹ 

¹Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Ana Bilim Dalı, 35040, İzmir, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, 32260, Isparta,
Türkiye

³İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı,
35620, İzmir, Türkiye

⁴Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, 35040, İzmir, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, *P. chamaepeuce* (L.) Less. (Asteraceae)'nin topraküstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitelerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri, standart bakteri kökenleri (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve *Streptococcus pneumoniae*) ve mantar kökenleri (*Candida albicans* ve *C. parapsilosis*) üzerinde mikrodilüsyon metodu ile araştırılmış ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Ekstrelerin sitotoksik aktivitesi, WST-1 reaktifi kullanılarak hücre proliferasyon analiz yöntemi ile HeLa, U2OS, PC3, MCF-7 ve A549 olmak üzere farklı kanser hücre hatları üzerinde incelenmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Bitkiden elde edilen *n*-hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının MİK değerlerinin *S. aureus*, *E. faecalis* ve *B. subtilis*'e karşı 250-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında olduğu saptanmıştır. *n*-hekzan ve kloroform ekstralarının tüm kanser hücre hatlarında ise değişen düzeyde sitotoksik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (IC₅₀: 21.0-67.1 µg/mL).

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, *Ptilostemon chamaepeuce*, sitotoksiste

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Serdar Demir
e-posta / e-mail: serdar.demir@ege.edu.tr, Tel. / Phone: +905542396183

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate the antimicrobial and cytotoxic activities of n-hexane chloroform and methanol extracts prepared from the aerial parts of *P. chamaepeuce* (L.) Less. (Asteraceae).

Material and Method: The antimicrobial activities of the extracts on standard bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae*) and fungal strains (*Candida albicans* and *C. parapsilosis*) were examined by microdilution method and minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined. The cytotoxic activity of the extracts was investigated by cell proliferation assay using WST-1 reagent on various cancer cell lines including HeLa, U2OS, PC3, MCF-7, and A549 cancer cell lines.

Result and Discussion: The MIC values of n-hexane, chloroform and methanol extracts were between 250-1000 µg/mL against *S. aureus*, *E. faecalis* and *B. subtilis*. n-hexane and chloroform extracts had varying levels of cytotoxic activity in all tested cancer cell lines (IC₅₀: 21.0-67.1 µg/mL).

Keywords: Antimicrobial activity, cytotoxicity, *Ptilostemon chamaepeuce*

GİRİŞ

Ptilostemon Cass. (Asteraceae) cinsi, dünyada 15 tür ile, Türkiye florasında da ikisi endemik olmak üzere 6 taksonla temsil edilmektedir. *P. chamaepeuce* (L.) Less. (Sect. *Ptilostemon*), Kırım Yarımadası'nda ve Türkiye'nin Marmara, Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nden, İber Yarımadası ve Fas'a kadar uzanan Akdeniz havzasında doğal yayılış gösteren, mor çiçekli, çalı şeklinde çok yıllık bir takson olup ülkemizde halk arasında bozlanotu adı ile bilinmektedir [1,2]

P. chamaepeuce var. *cyprius*'un, Kıbrıs'ta halk arasında kas ve iskelet sistemi ile ilgili rahatsızlıklarda, *P. casabonae*'nin ise Sardunya Adası'nda barsak spazmlarını gidermede kullanıldığı, ayrıca haşlanmış taze çiçek ve filizlerinin gıda olarak tüketildiği kayıtlıdır [3,4]. Çeşitli *Ptilostemon* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar, *P. afer*, *P. diacanthum* [5], *P. gnaphaloides* [6], *P. greuteri* [7], *P. niveus* [8] ve *P. strictus*'tan [9] guayanolit tip seskiterpenler; *P. greuteri*, *P. afer*, *P. diacanthum* [5] ve *P. strictus*'tan [9] asetilenik bileşikler, lignanlar ve triterpenlerin izolasyonu ile sonuçlanmıştır [6-8]. Bir başka çalışmada *P. casabonae*'nin fenolik bileşik içerikleri belirlenmiştir [10]. Uçucu yağ çalışmaları incelendiğinde ise *P. gnaphaloides* [11] ve *P. greuteri*'de δ-kadinen [7], *P. gnaphaloides* subsp. *pseudofruticosus*'ta ise germakren D'nin [3] ana bileşenler olduğu görülmektedir. Türkiye'de yayılış gösteren endemik *P. afer* subsp. *eburneus*'un meyvelerinin, total fenolik ve flavonoid içerikleri belirlenmiş, ana yağ asidi bileşeninin linoleik asit olduğu saptanmıştır (%58.52±0.10) [12].

Ptilostemon taksonları üzerinde yapılan biyoaktivite çalışmaları ile *P. casabonae*'nin antienflamatuvar [13], *P. afer*'in antitümoral ve antimikrobiyal [14], *P. afer* subsp. *eburneus*'un antioksidan [12] ve *P. hispanicus*'un sitotoksik [15] etkileri incelenmiştir.

Literatürde *P. chamaepeuce* üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalar sınırlı olup, köklerinden 2 bisabolen tipte seskiterpen (ptilostemonol ve ptilostemonal) [16], topraküstü kısımlarından ise guayanolit tip bir seskiterpen (dezaçilsinaropikrin) ve sitosterol-β-D-glukozit [17] izole edilmiştir.

Ayrıca gerçekleştirdiğimiz literatür taramaları kapsamında *P. chamaepeuce*'nin biyoaktivitesi ile ilgili tek veriye rastlanmıştır; Girit Adası'nda yayılış gösteren bitkinin topraküstü kısımlarından hazırlanan diklorometan, metanol ve su ekstralarında 100 µg/mL dozda antileişmanyal etki, 47.6 µg/ mL dozda ise antimalaryal etki gözlenmemiştir. Vero hücreleri ile gerçekleştirilen denemelerde de 47.6 µg/ mL doza kadar herhangi bir sitotoksik etki saptanmadığı rapor edilmiştir [18].

Bu çalışmada, Türkiye'de yayılış gösteren *P. chamaepeuce*'nin toprak üstü kısımlarından hazırlanan *n*-hekzan, kloroform ve metanol ekstralarının antimikrobiyal aktivitesi, mikrodilüsyon metodu ile araştırılmıştır. Ekstrelerin sitotoksik aktivitesi ise WST-1 [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum] reaktifi kullanılarak hücre proliferasyon analiz yöntemi ile HeLa, U2OS, PC3, MCF-7 ve A549 olmak üzere çeşitli kanser hücre hatları üzerinde incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bitkisel materyal

P. chamaepeuce bitkisinin toprak üstü kısımları Haziran 2013'te çiçeklenme döneminde, Muğla, Marmaris, İçmeler mevkiinden toplanmıştır. Bitkinin teşhisi yapılarak, herbaryum örneği Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaydedilmiştir (İZEF-6045).

Ekstraksiyon

Gölgede kurutulup mekanik olarak öğütülen bitki (266 g) üzerine 3 tekrarlı olmak üzere sırasıyla 3'er L *n*-hekzan, kloroform ve metanol ilave edilerek 15 dk ultrasonik su banyosunda, 24 saat 100 rpm çalkalayıcıda tutulmuş ve tekrar 15 dk ultrasonik su banyosunda tutularak filtre kağıdından süzölmüştür. Süzölen ekstralar ayrı ayrı, 40 C°'de vakum altında evaporatör ile yoğunlaştırılmış ve vial içerisine alınarak vakum konsantratör sisteminde kuruluğa kadar uçurulmuştur. Hazırlanan ekstralar -20 C°'de muhafaza edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite tayini

Antimikrobiyal aktivite çalışmalarında Amerikan tipi kültür koleksiyonu (ATCC) ve Refik Saydam Kültür Koleksiyonu (RSKK) standart bakteri ve mantar kökenleri kullanılmıştır (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* RSKK 04059, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* RSKK 02021, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Candida albicans* ATCC 90028 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019). Bakteriyel kökenler Mueller-Hinton agarda (Merck) 37°C'de 24 saat, *Candida* kökenleri Sabouraud dekstrozu agarda (Oxoid) 37°C'de 48 saat inkübe edilerek canlandırılmıştır. Taze koloniler serum fizyolojik ile süspansiyon edilmiş ve süspansiyonlar dansitometre cihazı (McFarland Densitometer, DEN-1 BIOSAN) ile 0.5 McFarland'a ayarlanmıştır. 96'lık mikropalak

kuyucuklarına bakteri kökenleri için 50 µl Mueller-Hinton broth (MHB) ve *Candida* kökenleri için 50 µl 3-morfolinopropan-1-sulfonik asit (MOPS) ile tamponlanmış Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Sigma) besiyeri ilave edilmiştir. Her bir köken için ilk kuyucuklara 50 µl olmak üzere, ekstre çözeltisi ilave edilerek seri dilüsyonları yapılmıştır. Kontrol amacıyla, %25 DMSO, antibakteriyel ajan olarak ampisilin ve antifungal ajan olarak flukonazol kullanılmıştır. Son olarak tüm kuyucuklara 1/100 oranında dilüe edilmiş olan mikrobiyal süspansiyonlardan 50 µl ilave edilmiştir. 37°C'de bakteriyel kökenlerin 24 saat ve *Candida* kökenlerinin 48 saat inkübasyonunun ardından, gözle görülebilen üremenin önlendiği en düşük konsantrasyon minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak kabul edilmiştir [19].

Hücre kültürü çalışmaları ve sitotoksik aktivite tayini

Ekstrelerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla WST-1 (Roche) reaktifi kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak hücre canlılık testi yapılmıştır. Çalışmalarda ATCC bankasından temin edilen hücre hatları kullanılmıştır. Kanser hücre hattı olarak insan epitelyal serviks adenokarsinoma (HeLa), insan epitelyal kemik osteosarkoma (U2OS), insan metastatik epitelyal prostat adenokarsinoma (PC3), insan epitelyal meme adenokarsinoma (MCF-7) ve insan epitelyal akciğer karsinoma (A549) hücre hatları kullanılırken sağlıklı hücre hattı olarak Afrika yeşil maymunu böbrek (Vero) hücre hattı kullanılmıştır. Tüm hücre hatları 37°C 'de %5 CO₂ içeren kültür koşullarında, %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) ve 2mM L-glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besi ortamı içerisinde büyütülmüştür [20].

Sitotoksisite çalışmalarında her bir hücre grubu için kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekim gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonra *P. chamaepeuce* bitkisinden elde edilen ekstreler hücrelere 6 farklı dozda (200, 100, 50, 25, 10 ve 2 µg/mL) ve 3 tekrar şeklinde uygulanmıştır. Kontrol uygulaması olarak hücrelere eş hacimde çözgen uygulanmıştır. Takiben geçen 48 saatin sonunda ekstrelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla WST-1 çözeltisi uygulanarak 440nm'de birer saat arayla mikropłaka okuyucuda (Molecular Devices VersaMax Tunable Multiplate Reader) spektrofotometrik olarak ölçüm alınmıştır. Ekstrelerin hücreler üzerindeki IC₅₀ değerlerinin hesaplanması amacıyla Graphpad Prism 5.0 programı kullanılmış olup non-lineer regresyon analizi yapılarak hesaplamalar gerçekleştirilmiştir [20, 21].

SONUÇ VE TARTIŞMA

P. chamaepeuce toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstre miktarları ve kuru drog miktarına göre % verimleri Tablo 1'de sunulmuştur. En yüksek verim metanol ekstresinde elde edilmiştir (% 7.84).

P. chamaepeuce'nin topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerin antimikrobiyal aktiviteleri mikrodilüsyon metodu ile incelendiğinde, *n*-hekzan ekstresinin *S. aureus*'a karşı ve kloroform ekstresinin *B. subtilis*'a karşı MİK değerlerinin 250 µg/mL olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Diğer mikroorganizmalara karşı ekstrelerin 1000 µg/mL ve altı konsantrasyonlarında antibakteriyel/antifungal aktivitesi saptanamamıştır. DMSO'nun çalışılan konsantrasyonlarda bakteri ve mantarların üremelerine etki etmediği, ayrıca ampisilin ve flukonazolün MİK değerlerinin CLSI kriterlerine göre istenen sınır değerler içinde olduğu saptanmıştır. Bakteri ve mantar kökenleri üzerinde antimikrobiyal etkiler değerlendirildiğinde, ekstrelerin Gram-negatif bakteri kökenlerine ve maya kökenlerine kıyasla, Gram-pozitif bakteri kökenlerine karşı daha etkili oldukları ve MİK değerlerinin 250-1000 µg/mL konsantrasyon aralığında olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1. *P. chamaepeuce* toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstre miktarları ve % verimleri

Ekstre	Miktar	% Verim
<i>n</i> -hekzan	9.46 g	%3.55
Kloroform	7.88 g	%2.96
Metanol	20.85 g	% 7.84

Tablo 2. *P. chamaepeuce* ekstrelerinde mikrodilüsyon yöntemi ile elde edilen MİK değerleri (µg/mL)

	<i>n</i> -hekzan	Kloroform	Metanol	Ampisilin
<i>S. aureus</i>	250	1000	500	0.48
<i>B. subtilis</i>	250	250	500	TE
<i>E. faecalis</i>	1000	1000	500	TE

TE: test edilmedi

Ekstrelerin sitotoksik aktivitesi ise HeLa, U2OS, PC3, MCF-7 ve A549 kanser hücre hatlarında hücre proliferasyon yöntemi ile araştırılmış, en yüksek sitotoksik aktivitenin PC3 ve U2OS hücre hatları üzerinde kloroform ekstresine ait olduğu belirlenmiştir (IC₅₀: 21.00±1.10 ve 24.80±1.26 µg/mL, sırasıyla) (Tablo 3). Ancak aynı ekstrenin sağlıklı hücre hattı olarak kullanılan Vero'da IC₅₀ değeri 18.85±1.11 µg/mL olarak saptanmıştır. Diğer yandan metanol ekstresinde herhangi bir sitotoksik etkiye rastlanmamıştır.

Tablo 3. *P. chamaepeuce* ekstrelerinin farklı konsantrasyonlarda uygulanması sonucu elde edilen IC₅₀±SS değerleri (µg/ml).

	HeLA	U2OS	PC3	MCF-7	A549	Vero
<i>n</i> -hekzan	39.68±1.07	31.56±1.12	40.38±1.22	41.40±1.11	67.10±1.10	24.20±1.75
Kloroform	33.87±1.31	24.80±1.26	21.00±1.10	44.80±1.16	39.58±1.34	18.85±1.11
Metanol	-	-	-	-	-	-

- : Aktivite saptanamamıştır

Türkiye’de yayılış gösteren *P. afer*’den hazırlanan su, etanol ve metanol ekstreleri, *Staphylococcus epidermidis*, *S. pyogenes*, *Klebsiella pneumonia* ve *Enterobacter cloacae*’ye karşı inaktif bulunmuştur [14]. Bir başka çalışmada, *P. afer*’den elde edilen su ekstresinin balık patojeni olan *Lactococcus garvieae* üzerindeki antibakteriyel etkisi disk difüzyon metodu ile incelenmiş ancak etkili bulunmadığı belirtilmiştir (10.1 mm± 0.29) [22]. İspanya’da yayılış gösteren *P. hispanicus*’un topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrenin sitotoksik aktivitesi, A549 ve MRC-5 (insan akciğer normal hücresi) hücre hatları üzerinde incelenerek IC₅₀ değerleri belirlenmiştir (sırasıyla, 276.6±13.6 ve 285.7±15.8 µg/mL) [15]. Türkiye’de yayılış gösteren *P. afer*’den hazırlanan su, etanol ve metanol ekstrelerinin, patates disk tümör indüksiyonu modelinde düşük antitümoral aktivite gösterdiği saptanmıştır (tümör inhibisyon oranları sırasıyla, % 44.4, 61.1 ve 58.3) [14].

Özellikle Asteraceae familyasında yaygın bir sekonder metabolit grubu olan seskiterpenler, kanser tedavisinde geniş bir terapötik potansiyele sahip moleküllerdir. Yapılan çalışmalarla, seskiterpen türevi moleküllerin çeşitli kanser türlerine karşı aktiviteleri, prelinik ve klinik çalışmalarla ortaya konmaktadır [23]. *P. chamaepeuce*’den daha önce izole edilmiş olan dezaçilsinaropikrinin A549, SK-OV-3 (insan ovaryum adenokarsinoma), SK-MEL-2 (insan cilt malign melanom), XF498 (insan merkezi sinir sistemi solid tümörü) ve HCT15 (insan kolorektal adenokarsinoma) kanser hücre hatlarında sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır (ED₅₀: 13.29, 11.93, 3.62, 3.91 ve 6.03 µg/mL, sırasıyla) [24].

Sonuçlarımız *P. chamaepeuce*’nin topraküstü kısımlarından çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstrelerin *S. aureus* ve *B. subtilis* üzerinde düşük antibakteriyel aktivite sergilediğini, özellikle kloroform ekstrelerinin PC3 ve U2OS kanser hücre hatları üzerinde yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca Fokialakis ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmadaki sonuçlara benzer şekilde *P. chamaepeuce*’nin topraküstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin Vero hücreleri ile birlikte test edilen kanser hücre hatları üzerinde herhangi bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir [18].

Gerçekleştirdiğimiz literatür araştırmasına göre, bu çalışma Türkiye’de doğal yayılış gösteren *P. chamaepeuce* üzerinde gerçekleştirilen ilk biyoaktivite taramasıdır. Elde edilen veriler doğrultusunda, *P. chamaepeuce*’nin topraküstü kısımlarından hazırlanan ekstrelerde, sitotoksik aktiviteden sorumlu sekonder metabolitlerin karakterizasyonuna yönelik fitokimyasal araştırmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.

YAZAR KATKILARI

Kavram: S.D., C.K.; Tasarım: S.D., C.K., P.B.K., İ.Ö., Y.E.; Denetim: C.K., S.D.; Kaynaklar: C.K., P.B.K., S.D., İ.Ö., Y.E.; Malzemeler: C.K., P.B.K., S.D., İ.Ö., Y.E.; Veri toplama ve/veya işleme: C.K., P.B.K., S.D., Y.E., İ.Ö.; Analiz ve/veya yorumlama: C.K., P.B.K., S.D., Y.E., İ.Ö.; Literatür taraması: C.K.,

P.B.K., S.D., Y.E., İ.Ö.; Makalenin yazılması: C.K., P.B.K., S.D., Y.E., İ.Ö.; Kritik inceleme: C.K., P.B.K.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ekim, T. (2012). *Ptilostemon* Cass. In: Guner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babac, M.T., (Eds.), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), (pp. 193). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği.
2. Vilatersana, R., Garcia-Jacas, N., Garnatje, T., Molero, J., Sonnante, G., Susanna, A. (2010). Molecular phylogeny of the genus *Ptilostemon* (Compositae: Cardueae) and its relationships with *Cynara* and *Lamyropsis*. *Systematic Botany*, 35(4), 907-917. [\[CrossRef\]](#)
3. Badalamenti, N., Modica, A., Iardi, V., Bruno, M. (2022). The chemical composition of the essential oil of *Ptilostemon gnaphaloides* subsp. *pseudofruticosus* (Asteraceae) growing in Kythira Island, Greece. *Natural Product Research*, 36(18), 4740-4744. [\[CrossRef\]](#)
4. Gonzalez-Tejero, M.R., Casares-Porcel, M., Sanchez-Rojas, C.P., Ramiro-Gutierrez, J.M., Molero-Mesa, J., Pieroni, A., Giusti, M.E., Censorii, E., de Pasquale, C., Della, A., Paraskeva-Hadjichambi, D., Hadjichambis, A., Houmani, Z., El-Demerdash, M., El-Zayat, M., Hmamouchi, M., ElJohrig, S. (2008). Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 341-357. [\[CrossRef\]](#)
5. Bohlmann, F., Ziesche, J. (1980). Neue guajanolide und acetylenverbindungen aus *Ptilostemon*-arten. *Phytochemistry*, 19(4), 692-696. [\[CrossRef\]](#)
6. Menichini, F., Di Benedetto, R., Delle Monache, F. (1996). A triterpene epoxide and a guaianolide from *Ptilostemon gnaphaloides*. *Phytochemistry*, 41(5), 1377-1379. [\[CrossRef\]](#)
7. Di Stefano, V., Pitonzo, R. (2012). Phytochemical studies on *Ptilostemon greuteri* Raimondo & Domina (Compositae). *Records of Natural Products*, 6(4), 390-393. [\[CrossRef\]](#)
8. Menichini, F., Di Benedetto, R., Delle Monache, G., Delle Monache, E. (1986). Sesquiterpenes from *Ptilostemon niveus*. *Fitoterapia*, 57, 458-459.
9. Janackovic, P., Tesevic, V., Marin, P.D., Milosavljevic, S.M., Petkovic, B., Sokovic, M. (2002). Polyacetylenes and a sesquiterpene lactone from *Ptilostemon strictus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(1), 69-71. [\[CrossRef\]](#)

10. Marengo, A., Maxia, A., Sanna, C., Mandrone, M., Berteà, C.M., Bicchi, C., Sgorbini, B., Cagliero, C., Rubiolo, P. (2019). Intra-specific variation in the little-known Mediterranean plant *Ptilostemon casabonae* (L.) Greuter analysed through phytochemical and biomolecular markers. *Phytochemistry*, 161, 21-27. [\[CrossRef\]](#)
11. Djordjevic, I., Tesevic, V., Milosavljevic, S., Menkovic, N., Vajs, V., Jadranin, M., Jovanovic, A., Djokovic, D. (2008). Composition of the essential oil of *Ptilostemon gnaphaloides*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44(5), 668-669. [\[CrossRef\]](#)
12. Kurt, A., Ozcan, M., Colak, N., Ozogul, Y., Glew, R., Ozogul, F., Ayaz, F.A. (2019). Fatty acids of oil and antioxidant capacity of phenolics from fruits of 11 Cardueae (Carduoideae, Asteraceae) taxa from northeast Anatolia (Turkey). *Botanica Serbica*, 43(1), 31-45. [\[CrossRef\]](#)
13. Marengo, A., Fumagalli, M., Sanna, C., Maxia, A., Piazza, S., Cagliero, C., Rubiolo, P., Sangiovanni, E., Dell'Agli, M. (2018). The hydro-alcoholic extracts of Sardinian wild thistles (*Onopordum* spp.) inhibit TNF alpha-induced IL-8 secretion and NF-kappa B pathway in human gastric epithelial AGS cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 469-476. [\[CrossRef\]](#)
14. Turker, A.U., Yildirim, A.B. (2013). Evaluation of antibacterial and antitumor activities of some Turkish endemic plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(6), 1003-1010. [\[CrossRef\]](#)
15. Calderon-Montano, J.M., Martinez-Sanchez, S.M., Burgos-Moron, E., Guillen-Mancina, E., Jimenez-Alonso, J.J., Garcia, F., Aparicio, A., Lopez-Lazaro, M. (2019). Screening for selective anticancer activity of plants from Grazalema Natural Park, Spain. *Natural Product Research*, 33(23), 3454-3458. [\[CrossRef\]](#)
16. Bohlmann, F., Rao, N., Schwarz, H. (1974). Naturally occurring terpene derivatives XXIX. Two new sesquiterpenes from *Ptilostemon chamaepeuce* (L.) Less. *Chemische Berichte*, 107, 650-653. [\[CrossRef\]](#)
17. Bruno, M., Maggio, A., Paternostro, M.P., Rosselli, S., Arnold, N.A., Herz, W. (2001). Sesquiterpene lactones and other constituents of three Cardueae from Cyprus. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(4), 433-435. [\[CrossRef\]](#)
18. Fokialakis, N., Kalpoutzakis, E., Tekwani, B.L., Khan, S.I., Kobaisy, M., Skaltsounis, A.L., Duke, S.O. (2007). Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete. *Journal of Natural Medicines*, 61, 38-45. [\[CrossRef\]](#)
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 23rd Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
20. Baykan Erel, S., Senol, S.G., Aydın Köse, F., Ballar, P. (2011). *In vitro* cytotoxic properties of six *Artemisia* L. species. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 247-252. [\[CrossRef\]](#)
21. Thavamani, B.S., Mathew, M., Dhanabal, S.P. (2013). *In vitro* cytotoxic activity of menispermaceae plants against HeLa cell line. *Ancient Science of Life*, 33(2), 81-84. [\[CrossRef\]](#)
22. Turker, H., Yildirim, A.B. (2015). Screening for antibacterial activity of some Turkish plants against fish pathogens: a possible alternative in the treatment of bacterial infections. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(2), 281-288. [\[CrossRef\]](#)
23. Abu-Izneid, T., Rauf, A., Shariati, M.A., Khalil, A.A., Imran, M., Rebezov, M., Uddin, M.S., Mahomoodally, M.F., Rengasamy, K.R.R. (2020). Sesquiterpenes and their derivatives-natural anticancer compounds: An update. *Pharmacological Research*, 161, 105165. [\[CrossRef\]](#)

24. Choi, S.Z., Choi, S.U., Lee, K.R. (2005). Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Saussurea calcicola*. *Archives of Pharmacal Research*, 28(10), 1142-1146. [\[CrossRef\]](#)