

## ***Vincetoxicum canescens* subsp. *canescens* ve *Vincetoxicum canescens* subsp. *pedunculata* Tohumlarının Antimikrobiyal ve Antiproliferatif Aktiviteleri \***

**Antimicrobial and Antiproliferative Activities of *Vincetoxicum canescens* subsp. *canescens* and *Vincetoxicum canescens* subsp. *pedunculata* Seeds**

**Sevda Güzel<sup>i</sup>, Mahmut Ülger<sup>ii</sup>, Yusuf Özay<sup>iii</sup>, Önder Yumrutaş<sup>iv</sup>, İbrahim Bozgeyik<sup>v</sup>, Özkan Sarıkaya<sup>vi</sup>**

<sup>i</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi A.D. <https://orcid.org/0000-0002-6642-5824>

<sup>ii</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Mersin Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji A.D. <https://orcid.org/0000-0001-6649-4195>

<sup>iii</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Adıyaman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D. <https://orcid.org/0000-0003-3855-6197>

<sup>iv</sup> Doç. Dr. Adıyaman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D. <https://orcid.org/0000-0001-9657-8306>

<sup>v</sup> Dr. Adıyaman Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.D. <https://orcid.org/0000-0003-1483-2580>

<sup>vi</sup> Dr. Öğr. Üyesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Sağlık Yüksek Okulu, Çocuk Gelişimi Bölümü <https://orcid.org/0000-0002-1641-457X>

### Öz

*Vincetoxicum* cinsinin tıbbi özellikleri uzun zamandır bilinmektedir. Bazı *Vincetoxicum* türlerinin yaprakları, kuru tohumları ve rizomları geleneksel tıpta incinme, uyuz, nevroz, skrofula, sıtma, yara, ateş, rüptür ve eksternal kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışma, *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* (endemik) tohumlarının anti(miko)bakteriyel, antifungal ve antiproliferatif aktivitelerini değerlendirmeye odaklanmıştır. İki bitkinin tohumlarının etanol ve hekzan ekstraktları üç fungal suşa (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* ve *Candida glabrata*), iki Gram-pozitif bakteri suşuna (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*), üç Gram-negatif bakteri suşuna (*Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* ve *Acinetobacter baumannii*) ve *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşuna karşı Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi kullanılarak test edilmiştir. Referans ilaçlar olarak Flukonazol, Etambutol, Ampisilin ve İsoniazid kullanılmıştır. Etanol ve hekzan ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının (200, 100, 50 ve 25 µg/mL) antiproliferatif etkileri MTT testi kullanılarak A549 insan akciğer kanseri hücre dizilerine karşı test edilmiştir. Etanol ekstraktlarının *A. baumannii*'ye (62.5 µg/mL MİK değeri) karşı Ampisilin'den (125 µg/mL MİK değeri) daha etkili olduğu bulunmuştur. A549 insan akciğer kanseri hücre dizilerine karşı *V. canescens* subsp. *canescens* tohumlarının etanol ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonu ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarının etanol ekstresinin 200 µg/mL konsantrasyonu, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak daha düşük hücre canlılık seviyeleri sergilemiştir (P <0.05). Sonuç olarak, *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumları, test edilen tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve A549 insan akciğer kanseri hücre dizilerine karşı antiproliferatif etki göstermiştir; ayrıca, etanol ekstraktları hekzan ekstraktlarından daha etkili bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Vincetoxicum*, Tohum, Antimikrobiyal, Hücre canlılığı

### ABSTRACT

Medicinal properties of *Vincetoxicum* genus have been known for a long time. Leaves, dry seeds, and rhizomes of some *Vincetoxicum* species have been used in folk medicine for the treatment of injuries, scabies, neurosis, scrofula, malaria, wound, fever, rupture, and external cancers. The present study focused on evaluating anti(myco)bacterial, antifungal, and antiproliferative activities of seeds of *V. canescens* subsp. *canescens* and *V. canescens* subsp. *pedunculata* (endemic). Ethanol and hexane extracts of seeds of two plants were tested against three fungal strains (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida glabrata*), two Gram-positive bacterial strains (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*), three Gram-negative bacterial strains (*Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, and *Acinetobacter baumannii*), and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv using broth microdilution method. Fluconazole, Ethambutol, Ampicillin, and Isoniazid were used as reference drugs. Antiproliferative effects of various concentrations (200, 100, 50, and 25 µg/mL) of ethanol and hexane extracts were tested against A549 human lung cancer cell lines using MTT test. The ethanol extracts were found to be more effective against *A. baumannii* (62.5 µg/mL MIC value) than Ampicillin (125 µg/mL MIC value). Against A549 human lung cancer cell lines, 100 µg/mL concentration of ethanol extract of *V. canescens* subsp. *canescens* seeds and 200 µg/mL concentration of ethanol extract of *V. canescens* subsp. *pedunculata* seeds were exhibited statistically lower cell viability levels than control groups (P <0.05). As a result, *V. canescens* subsp. *canescens* and *V. canescens* subsp. *pedunculata* seeds showed antimicrobial and antiproliferative effects against all tested microorganisms and A549 human lung cancer cell lines; moreover, ethanol extracts were found to be more effective than hexane extracts.

**Key Words:** *Vincetoxicum*, Seed, Antimicrobial, Cell viability

\* *Lokman Hekim Dergisi*, 2019; 9 (3): 367-375

DOI: 10.31020/mutfd.594212

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 19 Temmuz 2019; Kabul Tarihi - Accepted: 2 Eylül 2019

İletişim - Correspondence Author: Sevda Güzel <guzelsevda@mersin.edu.tr>

## GİRİŞ

Geleneksel kullanımları, fitokimyasal bileşimleri ve farmakolojik etkileri nedeniyle bitkiler uzun zamandır dikkatleri üzerine çekmektedir.<sup>1</sup> Literatürde bitkilerin tedavi edici etkilerini gösteren çok sayıda çalışma olup; 20.000'den fazla tıbbi bitkinin zatürre, diyare, ülser, soğuk algınlığı, bronşit ve solunum yolu hastalıkları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıldığı Dünya Sağlık Örgütü tarafından bildirilmiştir.<sup>2</sup> Kendilerine karşı kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı mikroorganizmaların direnç geliştirme potansiyelleri bulunmaktadır. İlaça dirençli suşlar nedeniyle mikroorganizmaların yol açtığı bulaşıcı hastalıklar Dünya genelinde ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Dahası yüksek maliyetli sentetik ilaçlar ve istenmeyen yan etkiler enfeksiyon hastalıkları ile etkili mücadelede farklı hareket mekanizmalarına sahip yeni antimikrobiyal ajanların keşfinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.<sup>3</sup> Tıbbi bitkiler, bunlardan elde edilen ekstre ve bileşikler antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antiinflamatuvar ve yara iyi edici etkileri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde alternatif tedavi stratejileri geliştirilmesine kaynak oluşturmaktadır.<sup>4</sup> Günümüzde birçok farmakolojik etki, düşük maliyet, elde edilebilirlik gibi özelliklere ek olarak yüksek etki ve düşük yan etki bitki ve bitkilerden elde edilen ürünlerin önemini daha da arttırmaktadır.<sup>5</sup>

*Vincetoxicum* N.M. Wolf cinsi (Apocynaceae: subfamilya Asclepiadoideae) yaklaşık 100 türü bulunan Kuzey Amerika<sup>6</sup>, Avrupa, Asya ve Japonya'da<sup>7</sup> yayılış gösteren bir cinstir. *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin kökleri, yaprakları ve kuru tohumları tıbbi özellikleri nedeniyle uzun zamandır geleneksel tıpta kullanılmaktadır.<sup>8</sup> *V. hirundinaria* Medicus, *V. nigrum* (L.) Moench ve *V. stocksii* Ali & Khatoon türleri geleneksel olarak Avrupa ve Çin tedavi sistemlerinde incinme, uyuz, nevroz, skrofula, sıtma, yara, ateş ve rüptür tedavilerinde kullanılmakta<sup>8,9,10</sup>; antitümör<sup>9,11</sup>, antilayşmanyal<sup>10</sup>, diyaforetik ve laksatif<sup>9</sup> etkileri bilinmektedir. *V. stocksii* türünden elde edilen lapa Pakistan'da eksternal kanserlerin ve yaraların tedavisinde kullanılmaktadır.<sup>10</sup> *V. hirundinaria* türünün kökleri veteriner hekimlikte çeşitli hastalıkların tedavisinde ve ödemde kullanılmakla<sup>9</sup> birlikte, bitki Fransa'da "dompte-venin" ismiyle bilinmekte ve emetik ve ekspektoran özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır<sup>12</sup>. İtalya'da ise aynı türün toprak üstü kısımları ve köklerinden elde edilen dekoksasyon ve infüzyonlar zehirlenmelere karşı antidot olarak kullanılırken<sup>13</sup>, bitki Türkiye'de "Panzehir otu ve Kırlangıç kuyruğu" olarak adlandırılmakta ve köklerin emetik etkisi bilinmektedir<sup>14</sup>. *V. canescens* subsp. *canescens* (Willd.) Decne. türü Tunceli (Ovacık) yöresinde "zehir otu"<sup>15</sup> yerel ismiyle bilinmekte olup, ezilmiş meyve ve yaprakları fungal enfeksiyonların tedavisinde haricen kullanılmaktadır<sup>15,16</sup>. Ayrıca *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. toleum* Boiss. türleri Doğu Anadolu Bölgesi'nde "Zilasur" yerel ismi ile bilinmekte olup uyuz tedavisinde dövülmüş halde dışardan kullanımları bildirilmiştir.<sup>16</sup> Geleneksel kullanımlarına ek olarak cinse ait türlerin sitotoksik, antikanser<sup>17</sup>, antifungal, antibakteriyal<sup>10,18-20</sup>, antilayşmanyal, antimalaryal<sup>10</sup> ve antioksidan<sup>8</sup> aktiviteleri de rapor edilmiştir.

Bugüne kadar yapılan fitokimyasal araştırmalar bu cinse ait türlerin triterpenler, steroidal glikozitler, steroidler, alkanoller<sup>11</sup>, fenantroindolizidin alkaloidleri<sup>17,21</sup>, saponinler, şeker, nişasta<sup>22</sup>, flavonoid ve tanen<sup>21</sup> içerdiğini bildirmiştir.

Türkiye'de *Vincetoxicum* cinsi 3'ü endemik olmak üzere 10 takson ile temsil edilmektedir.<sup>23</sup> Türkiye'de doğal olarak yetişen *Vincetoxicum* cinsine ait türler üzerinde aktivite çalışmaları ilk kez çalışma grubumuz tarafından önceki araştırmamızda yapılmıştır.<sup>19-22,24</sup> Literatür taramalarında *Vincetoxicum* cinsinin tohumları üzerine yapılmış herhangi bir biyoaktivite çalışmasına rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada; Türkiye'de doğal olarak yetişen ve biri endemik olan iki *Vincetoxicum* taksonunun [*V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* (Willd.) Decne. subsp. *pedunculata* Browicz (endemik)] tohumlarından elde edilen etanol ve hekzan ekstraktlarının *in vitro* anti(miko)bakteriyal, antifungal ve antiproliferatif aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## YÖNTEMLER

### Bitki materyali ve ekstraksiyon prosedürü

*V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* Türkiye'nin iki farklı bölgesinden toplanmış ve teşhisleri Dr. Sevda Güzel ve Dr. Ahmet İlçim tarafından yapılmıştır.<sup>23</sup> Bitki materyallerine ait herbaryum örnekleri Mustafa Kemal Üniversitesi herbaryumunda saklanmakta olup örneklere ait detaylı bilgiler **Tablo 1**'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışılan taksonlara ait bilgiler

	Çalışılan Taksonlar	
	<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i> (Willd.) Decne.	<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i> Browicz
Endemik takson*	-	Endemik
Lökalite*	C6: Kahramanmaraş, Engizek Dağı	B3: Afyon, Dinar; Kumalar Dağı
Fitocoğrafik orjin*	İran-Turan elementi	Doğu Akdeniz elementi
Toplama zamanı	13.07.2016	20.07.2016
Yükseklik (m)	1.000	1.500-1.600
Herbarium numarası	MKUH 1283	MKUH 1284
Etanol ekstre verimi (mg/g kuru örnek)	240.15	248.95
Hekzan ekstre verimi (mg/g kuru örnek)	206.6	210.2

\*Türkiye Florasına göre düzenlenmiştir.<sup>23</sup>

Öğütülen tohumlar %96'lık etanolle (1 g tohum materyali: 20 mL etanol) oda sıcaklığında bir gece karıştırıcıda (Stirrer DLS-Velp Scientifica) karıştırılarak bekletildikten sonra süspansiyon Whatman No.1 filtre kâğıdından süzölmüş ve kalan artık üzerine etanol eklenerek aynı işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Birleştirilen süzöntüler düşük sıcaklıkta rotary-evaporatörde (Heidolph-Rotary TLR 1000) uçurulmuş, elde edilen etanol ekstreleri kullanılabildiği kadar +4°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Hekzan ekstresi için ise toz edilmiş tohumlar Soxhlet cihazında 6 saat süreyle ekstre edilmiş ve sonrasında çözücü rotary-evaporatörde uçurulmuştur. Elde edilen hekzan ekstreleri kahverengi şişelere konarak kullanılabildiği kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

#### Antimikrobiyal aktivite

Mikroorganizmalar: Bakteri suşları *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 02026), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 95080), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, ve fungal suşlar *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC 1369) ve *Candida glabrata* (ATCC 15126) Refik Saydam Hifzıssıhha Enstitüsü'nden (Ankara) temin edilmiştir.

#### Antibakteriyal aktivite

*V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarından elde edilen etanol ve hekzan ekstreleri iki Gram-pozitif (*S. aureus* ve *B. subtilis*) ve üç Gram-negatif (*E. coli*, *A. baumannii* ve *A. hydrophila*) standart bakteri suşuna karşı Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi kullanılarak *in vitro* antibakteriyal aktiviteleri için test edilmiştir. Ampisilin çalışmada referans antibakteriyal ilaç olarak kullanılmıştır. Ekstreler dimetil sülfoksitde (DMSO) çözülerek 2000 µg/mL konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlanmıştır. Steril mikroplak kuyularına Mueller-Hinton sıvı besiyerinden ve çözünmüş ekstrelerden eklendikten sonra bir seri seyreltme işlemi ile test edilecek ekstrelerin konsantrasyonları 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.8, 3.9 ve 1.9 µg/mL olarak ayarlanmıştır. Her bir standart bakteri suşundan ayrı ayrı steril tüplerde 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve bu süspansiyonlar steril distile su ile 1:20 oranında seyreltilmiştir. Süspansiyonlardan, içerisinde besiyeri ve ekstre bulunan her bir kuyuya 10 µL eklenmiştir. Böylelikle kuyulardaki son bakteri yoğunluğu 5x10<sup>5</sup> CFU/mL'ye ayarlanmıştır. Aynı işlem Ampisilin içinde yapılmış ve aynı seyreltme serisi elde edilmiştir. Çözücünün (DMSO) mikrobiyal büyüme etkisi de araştırılmış ve test edilen mikroorganizmalar üzerinde etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Deneyler iki tekrarlı yapılmış ve her bir ekstrenin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri belirlenmiştir.<sup>4</sup>

#### Antimikobakteriyal aktivite

Etanol ve hekzan ekstreleri *M. tuberculosis* H37Rv standart suşuna karşı Resazurin Mikroplak Yöntemi ile *in vitro* antimikobakteriyal aktiviteleri için test edilmiştir. Çalışmada %0.1 kaziton, %0.5 gliserol ve %10 oleik asit-albümin-dekstroz-katalaz (Becton Dickinson) ile zenginleştirilmiş Middlebrook 7H9 besiyeri (Becton Dickinson) bazlı 7H9-S besiyeri kullanılmıştır. Resazurin çalışma solüsyonu distile su kullanılarak %0.01 (a/h) konsantrasyonda hazırlanmış ve membran filtreden (çap: 0.22 µm) geçirilerek steril edilmiştir. İzoniazid (Sigma, I3377) ve Etambutol (Sigma, E4630) referans ilaçlar olarak kullanılmıştır. Ekstrelerin ve referans

ilaçların DMSO'da 2000 µg/mL konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlanmış ve membran filtrelerden (çap: 0.22 µm) geçirilerek steril edilmiştir. Solüsyonların iki kat seri seyreltmeleri 96 kuyulu mikropklarda 7H9-S besiyeri (100 µL) ile yapılmış ve böylelikle 250-0.12 µg/mL aralığında konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Her bir plağa ayrıca standart antibiyotik içermeyen bir üreme kontrolü ve inokulum içermeyen bir sterilite kontrolü eklenmiştir. Löwenstein-Jensen besiyerinde üretilen H37Rv kolonilerinden bir öze dolusu alınarak, 5 mL 7H9-S besiyerinde süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 2 dakika vorteksenmiş ve sonra 30 dakika hareket ettirilmeden bekletilerek büyük partiküllerin ve besiyeri kalıntılarının dibe çökmesi sağlanmıştır. Süre sonunda süpernatant yeni bir steril tüpe aktarılmış ve besiyeri ile McFarland No:1 bulanıklık değerinde süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon 7H9-S besiyeri ile 1:20 oranında seyreltilmiştir. Bu süspansiyondan 100 µL, plak kuyularına eklenmiş; plaklar parafilm ile kapatılmış ve 37°C'de normal atmosferde 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda tüm kuyulara rezazurin çalışma solüsyonu (30 µL) eklenerek plaklar 1 gün daha inkübe edilmiş ve sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. Çözücünün (DMSO) büyüme etkisi de test edilmiş, etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Çalışma çift tekrarlı yapılmıştır. Resazurin'in renginin maviden pembeye dönmesi resazurin'in redükte olduğunu, yani kuyuda bakteri ürediğini gösterir. MİK değeri, maviden pembeye renk değişimini engelleyen en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir.<sup>4</sup>

### Antifungal aktivite

Etanol ve hekzan ekstralarının *in vitro* antifungal aktiviteleri *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* fungal suşlarına karşı NCCLS/M27-A2<sup>25</sup> standart protokolü kullanılarak Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile araştırılmıştır.<sup>4</sup> Flukonazol (Sigma, F8929) referans antifungal ilaç olarak seçilmiştir. Deneylede, 0.165 M 3-(N-morfolino)-propansülfonik asit (Sigma, M1254) ile pH'sı 7.0'a ayarlanmış RPMI 1640 besiyeri (Sigma, R6504) kullanılmıştır. Standart suşların RPMI 1640 besiyerinde 1:100 daha sonra 1:20 seyreltilmiş çalışma süspansiyonları hazırlanmıştır. DMSO'da ekstraların ve standart ilacın 1000 µg/mL konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlanmış ve membran filtreden geçirilerek (çap: 0.22 µm) steril edilmiştir. Solüsyonların iki kat seri seyreltmeleri RPMI 1640 besiyeri kullanılarak 96 kuyulu mikropklarda yapılmış ve böylelikle 250-0.12 µg/mL aralığında konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Her plağa standart antibiyotik içermeyen bir üreme kontrolü ve inokulum içermeyen bir sterilite kontrolü eklenmiştir. Her kuyuya 100 µL hazırlanan inokulum süspansiyonundan eklenmiş, plaklar 35°C'de normal atmosferde 48 saat inkübe edilmiş ve sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. Çözücünün (DMSO) büyüme etkisi de test edilmiş, etkisinin olmadığı belirlenmiştir. MİK değerleri, test edilen ekstraların üremeyi inhibe eden en düşük konsantrasyonları olarak belirlenmiştir.<sup>4,25</sup>

### Antiproliferatif aktivite

Hücre kültürü: Çalışmada A549 insan akciğer kanseri hücre dizileri (ATCC-Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu) kullanılmıştır. Hücre kültürü için %10 fetal kalf serumu (Sigma-Aldrich) içeren DMEM (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Hücreler 37°C sıcaklıkta %95 hava ve %5 karbondioksit içeren uygun kültür ortamında tutulmuştur.

### Hücre canlılığının değerlendirilmesi

Hücre canlılığı, MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil-tetrazolium bromit) yöntemi ile test edilmiştir. Hücreler kültür ortamında %70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra 3.0 mL Trypsin-EDTA solüsyonu (Sigma) yardımıyla 96 kuyulu mikropklara yerleştirilmiştir (her kuyucuğa 10<sup>4</sup> hücre gelecek şekilde). 24 saat inkübasyon sonunda ekstraların DMSO ile hazırlanan farklı seyreltmeleri (25, 50, 100 ve 200 µg/mL) kuyulara ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif kontrol olarak %10 FKS içermeyen besiyerinde bekletilen hücreler kullanılmış. Inkübasyon sonunda süpernatant 1 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich) içeren besiyeri ile değiştirilerek 37°C de mor renkli çökelti gözlenene kadar inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında MTT solüsyonu ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin üzerine DMSO eklenmiştir. Sonuçlar spektrofotometre (Epoch) yardımıyla 550 nm dalga boyunda okunarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. DMSO'nun da hücre canlılığı üzerine etkisi test edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Çalışma 4 tekrarlı yapılmıştır.<sup>26</sup>



## İstatistik analizler

İstatistiksel analizler SPSS 25.0 (IBM) ve MS Office Excel (Microsoft) programları kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama  $\pm$  Standart sapma olarak gösterilmiştir. Kruskal Wallis H ve ANOVA testleri kullanılmıştır.  $P < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

Çalışmada Türkiye'de doğal olarak yetişen ve biri endemik olan *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarından elde edilen etanol ve hekzan ekstraları anti(miko) bakteriyel, antifungal ve antiproliferatif aktiviteleri için ilk kez araştırılmış olup çalışılan taksonlara ait detaylı bilgiler ve ekstre verimleri **Tablo 1**'de verilmiştir.

### Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivite sonuçları **Tablo 2**'de verilmiştir. *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarından elde edilen ekstraların test edildikleri 6 bakteriyel ve 3 fungal suşa karşı 250-62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aralığında MİK değerleri ile antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Her iki taksonda etanol ekstraları hekzan ekstralarından daha etkili bulunmuştur. Her iki taksondan elde edilen etanol ekstraları *A. baumannii*'ye karşı 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MİK değeri ile referans ilaç Ampisilin (MİK değeri: 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) daha etkilidir. Test edilen dört ekstre *A. hydrophila*'ya karşı (MİK değeri: 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ılımlı etki göstermiş olup sonuçlar Ampisilinle (MİK değeri: 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) karşılaştırıldığında etkinlik düşüktür. Antimikobakteriyel aktivite sonuçlarına göre teste edilen ekstraların tümü *M. tuberculosis* H37Rv standart suşuna karşı 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  MİK değeri ile etkilidir. Fakat sonuçlar referans ilaçlar İzoniazid ve Etambutol (sırasıyla MİK değerleri: 0.97 ve 1.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ile karşılaştırıldığında etkinliği çok düşüktür. Antifungal aktivite sonuçları, çalışılan türlerin test edilen standart fungal suşlara (*C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata*) karşı 250-62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aralığında çeşitli MİK değerleri ile etkili olduğunu göstermiştir. Dahası etanol ekstralarının (MİK değeri: 62.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) antifungal aktivitesinin hekzan (MİK değeri: 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ekstralarınınkinden daha yüksek olduğu görülmüştür. Fakat sonuçlar referans ilaç Flukonazol ile karşılaştırıldığında (MİK değerleri: *C. albicans*, 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; *C. tropicalis*, 15.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ve *C. glabrata*: 3.90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) etkinlik düşüktür (**Tablo 2**).

**Tablo 2.** Bakteriyel ve fungal suşlara karşı test edilen *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarının ve referans ilaçların MİK değerleri ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

Mikroorganizmalar	<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>		<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i>		Referans ilaçlar			
	Etanol	Hekzan	Etanol	Hekzan	Ampisilin	İzoniazid	Etambutol	Flukonazol
<b>Bakteriyel suşlar</b>								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25925	250	250	250	250	31.25	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	125	250	250	250	0.9	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	250	250	250	250	15.62	-	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 02026	62.5	250	62.5	250	125	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 95080	125	125	125	125	31.25	-	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	62.5	62.5	62.5	62.5	-	0.97	1.95	-
<b>Fungal suşlar</b>								
<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	62.5	250	62.5	250	-	-	-	31.25
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	62.5	250	62.5	250	-	-	-	15.62
<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126	62.5	250	62.5	125	-	-	-	3.90

Çalışma iki tekrarlı yapılmış ve MİK değerleri belirlenmiştir. -: Test edilmedi.

### Antiproliferatif aktivite

Çalışılan türlerin tohumlarından elde edilen etanol ve hekzan ekstralarının farklı konsantrasyonları (25, 50, 100 ve 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) A549 insan akciğer kanseri hücre dizilerine karşı antiproliferatif etkileri için test edilmiş ve sonuçlar **Tablo 3**'de verilmiştir. *V. canescens* subsp. *canescens* tohumlarından elde edilen etanol ekstresinin 50, 100 ve 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda sırasıyla  $0.645 \pm 0.01$ ,  $0.614 \pm 0.009$  ve  $0.628 \pm 0.026$  değerleri ve hekzan ekstresinin 25 ve 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda sırasıyla  $0.861 \pm 0.022$  ve  $0.875 \pm 0.01$  değerleri ile kontrol gruplarına (sırasıyla  $1.079 \pm 0.011$  ve

0.994 ± 0.009) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük hücre canlılığı düzeyleri tespit edilmiştir (P <0.05). *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarından elde edilen etanol ekstresinin 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda sırasıyla 0.768 ± 0.007 ve 0.709 ± 0.007 değerleri ile ve hekzan ekstresinin 50 µg/mL konsantrasyonunun uygulandığı grupta 0.947 ± 0.027 değeri ile kontrol gruplarına (sırasıyla 1.089 ± 0.011 ve 1.035 ± 0.016) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük hücre canlılığı düzeyleri tespit edilmiştir (P <0.05). Çalışılan diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P > 0.05) (**Tablo 3**).

**Tablo 3.** *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarının A549 İnsan akciğer kanseri hücre dizileri üzerine antiproliferatif etkisi

Gruplar	<i>V. canescens</i> subsp. <i>canescens</i>		<i>V. canescens</i> subsp. <i>pedunculata</i>	
	Etanol	Hekzan	Etanol	Hekzan
Kontrol	1.079 ± 0.011 (1.071 - 1.095)	0.994 ± 0.009 (0.984 - 1.006)	1.089 ± 0.011 (1.075 - 1.098)	1.035 ± 0.016 (1.015 - 1.049)
DMSO	1.024 ± 0.019 (1.006 - 1.045)	0.989 ± 0.005 (0.984 - 0.993)	1.029 ± 0.012 (1.011 - 1.037)	1.029 ± 0.012 (1.011 - 1.037)
25	0.718 ± 0.019 (0.710 - 0.724)	0.861 ± 0.022* (0.841 - 0.891)	0.828 ± 0.035 (0.794 - 0.860)	0.996 ± 0.021 (0.971 - 1.022)
50	0.645 ± 0.01* (0.630 - 0.649)	0.875 ± 0.01* (0.866 - 0.889)	0.830 ± 0.033 (0.798 - 0.860)	0.947 ± 0.027* (0.941 - 0.976)
100	0.614 ± 0.009* (0.610 - 0.630)	0.902 ± 0.023 (0.882 - 0.922)	0.768 ± 0.007* (0.762 - 0.777)	0.963 ± 0.014 (0.943 - 0.975)
200	0.628 ± 0.026* (0.606 - 0.651)	0.936 ± 0.021 (0.917 - 0.956)	0.709 ± 0.007* (0.701 - 0.718)	0.950 ± 0.023 (0.933 - 0.984)

Ölçümler ortalama ± Standart sapma olarak verilmiştir. Parantez içinde Min-Max değerleri yer alır. Kruskal Wallis H ve ANOVA testleri kullanılmıştır. n = 4. P < 0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır. \*Kontrol grubundan istatistiksel olarak farklıdır. (Kontrol: hiç bir kimyasal uygulanmayan, sadece besiyerinde tutulan grup; DMSO: Besiyeri ve DMSO uygulanan grup; 25: 25 µg/mL konsantrasyonda ekstre uygulanan grup; 50: 50 µg/mL konsantrasyonda ekstre uygulanan grup; 100: 100 µg/mL konsantrasyonda ekstre uygulanan grup; 200: 200 µg/mL konsantrasyonda ekstre uygulanan grup).

## TARTIŞMA

Bu çalışma, Türkiye’de doğal olarak yetişen ve biri endemik olan iki *Vincetoxicum* taksonunun tohumlarının biyolojik aktiviteleri üzerine yapılmış ilk bilimsel çalışmadır.

Literatür taramalarında, *Vincetoxicum* cinsine ait bazı taksonların farklı kısımları üzerine yapılmış az sayıda antimikrobiyal aktivite çalışmasının olduğu görülmüştür.<sup>18-20,24,27,28</sup> *V. pumilum* Decne. türünden elde edilen metanol ekstresi *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans*'ın da içerisinde olduğu bir grup mikroorganizmaya karşı test edilmiş ve *C. albicans*'a karşı belirgin antifungal aktivitesi olduğu; bakteri suşlarına karşı ise etkili olmadığı görülmüştür.<sup>27</sup> *V. stocksii* türünün metanol ekstresinden elde edilen etil asetat, hekzan, bütanol, kloroform ve su fraksiyonları *C. albicans*'ında içlerinde olduğu 12 fungal suşa ve *B. subtilis*, *E. coli* ve *S. aureus*'un da içlerinde olduğu 12 bakteriyel suşa karşı antimikrobiyal aktiviteleri için test edilmiş; *B. subtilis* ve *C. albicans*'a karşı belirgin aktiviteli olduğu, *E. coli*'ye karşı ılımlı aktivite gösterdiği ve *S. aureus* karşı ise etkili olmadığı bulunmuştur.<sup>18</sup> *V. rossicum*'un kök, taze yaprak ve olgun meyvelerinden elde edilen etanol ekstrere çeşitli bakterilere ve funguslara karşı antimikrobiyal aktiviteleri için incelenmiş ve bitkinin antimikrobiyal etkili olduğu, dahası köklerin yapraklardan daha etkili olduğu bildirilmiştir.<sup>28</sup> Türkiye’de doğal olarak yetişen beş *Vincetoxicum* taksonunun (*V. canescens* subsp. *canescens*, *V. canescens* subsp. *pedunculata*, *V. fuscatum* subsp. *fuscatum*, *V. fuscatum* subsp. *boissieri* ve *V. parviflorum*) kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen ekstrere (diklorometan, diklorometan: metanol (1:1), metanol ve total etanol) *A. fumigatus*'a karşı 1 mg/mL konsantrasyonda antifungal aktivitelerine bakılmış ve *V. parviflorum*'un kök ve toprak üstü kısımlarından ve *V. canescens* subsp. *canescens*'in köklerinden elde edilen diklorometanlı ekstrere %45.86 inhibisyon değeri ile en yüksek etkiyi gösterdiği bildirilmiştir.<sup>24</sup> Ayrıca bu beş *Vincetoxicum* taksonunun kök ve toprak üstü kısımlarından elde edilen etanol ekstrere antimikrobiyal aktiviteleri için dokuz mikroorganizmaya karşı (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *A. baumannii*, *A. hydrophila*, *M. tuberculosis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*) test edilmiş ve ekstrere tamamı *A. baumannii*'ye karşı referans ilaç Ampisilinden (MİK değeri: 125 µg/mL) daha etkili bulunmuştur; özellikle *V. canescens* subsp. *pedunculata*'nın kökleri ve *V. fuscatum* subsp. *boissieri*'nin toprak üstü kısımları 31.25 µg/mL MİK değeri ile en etkilileri olarak tespit edilmiştir. Dahası test edilen ekstrere antifungal

aktivitelerinin de olduğu ancak etkinliğin referans ilaç Flukonazole göre düşük olduğu belirlenmiştir.<sup>19</sup> Bir başka çalışmada içlerinde bu araştırmaya konu olan iki taksonunda yer aldığı dört *Vincetoxicum* taksonunun tohum zarflarından elde edilen etanol ekstraktları antimikrobiyal aktiviteleri için *S. aureus*, *B. subtilis*, *A. baumannii*, *E. coli*, *A. hydrophila*, *M. tuberculosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'e karşı test edilmiş ve *A. baumannii*'ye karşı test edilen tüm ekstraktlar Ampisilinden daha etkili bulunmuştur. *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohum zarflarının etanol ekstraktlarının MİK değeri 62.5 µg/mL olarak belirlenmiştir. Test edilen ekstraktların ayrıca antifungal aktivitesi olup *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohum zarflarının etanol ekstraktlarının MİK değerlerinin 31.25-62.5 µg/mL aralığında olduğu tespit edilmiştir; fakat referans ilaç Flukonazol kadar etkili olmadıkları görülmüştür.<sup>20</sup> Bu çalışmada ise *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarının etanol ve hekzan ekstraktları antimikrobiyal aktiviteleri için ilk kez araştırılmış ve her iki bitkinin iki farklı ekstresinin de test edildikleri bakteri ve fungusların büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir. Etanol ekstraktları hekzan ekstraktlarına göre daha etkili bulunmuştur. Etanol ekstraktları özellikle Gram-negatif nozokomiyal patojen *A. baumannii*'ye (MİK değeri: 62.5 µg/mL) karşı referans ilaç Ampisilinle karşılaştırıldığında (MİK değeri: 125 µg/mL) çok etkili bulunmuştur. Gram-negatif bakteriler Gram-pozitif bakterilere göre doğal bileşiklere daha dirençlidir<sup>29</sup>, hücre duvarlarının yapısı ise daha farklı ve komplekstir. Bu durum her iki bakteri grubunda makromoleküllerin alımını farklı şekilde etkilemektedir.<sup>30</sup> Gram-negatif bakterilerin lipopolisakarit içeren hidrofilik yapıları hücre duvarları hidrofobik yağlar, steroidler ve bitki ekstraktlarının emilimini ve hedef hücre zarında birikimini inhibe etmektedir.<sup>29</sup> *A. baumannii* kendisine karşı kullanılan antibakteriyel ilaçlara karşı direnç geliştirme yeteneğinde olan; Dünya genelinde ciddi sağlık sorunlarına yol açan bir patojendir.<sup>31</sup> Yoğun bakım ünitelerinde görülen enfeksiyonlardan sorumlu olup son dönemde oldukça dikkat çekmektedir. Dahası geniş aralıkta enfeksiyonlardan (idrar yolu enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit, vantilatör kaynaklı zatürre, kan dolaşımı ve cerrahi yara enfeksiyonları) sorumludur.<sup>32</sup> Bu çalışmadan elde edilen bulgular yukarıda bahsedilen literatür verileri ile uyumlu olup test edilen iki taksonun tohumlarının *A. baumannii*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde umut verici antimikrobiyal ajanlar olabileceğini göstermektedir.

Literatür verilerine göre akciğer kanseri yüksek ölüm oranlarıyla malignan tümörler arasında en yaygın olan kanser türlerinden biri olup 2035 yılında 3 milyon ölüme neden olacağı beklenmektedir.<sup>33</sup> Bu çalışmada A549 insan akciğer kanseri hücre dizilerine karşı *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* taksonlarının tohumlarının antiproliferatif etkileri test edilmiş ve her iki bitkinin tohumunun antiproliferatif özelliğinin olduğu belirlenmiştir. Etanol ekstraktlarının daha etkili olduğu görülmüştür. Test edilen konsantrasyonlar arasında (25, 50, 100 ve 200 µg/mL), *V. canescens* subsp. *canescens* tohumlarının etanol ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonu ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarının etanol ekstresinin 200 µg/mL konsantrasyonu kontrol gruplarına göre en düşük hücre canlılığı düzeylerine neden olmuştur. Literatürde *V. hirundinaria* türünün toprak üstü kısımlarının *in vitro* sitotoksik aktivitelerinin ilaç duyarlı KB-3-1 ve çoklu ilaç dirençli KB-V1 kanser hücre dizilerine karşı test edildiği<sup>17,34</sup> görülmüş olup *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin tohumları ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Çalışmada elde edilen antimikrobiyal ve antiproliferatif aktivite sonuçları etanol ekstraktlarının hekzan ekstraktlarından daha etkili olduğunu göstermiştir. Literatürde *Vincetoxicum* cinsine ait türlerin çeşitli fitokimyasalları içerdiği bildirilmiştir.<sup>11,17,21,22</sup> *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* taksonları üzerinde yaptığımız fitokimyasal araştırmalar sonucunda köklerinde şeker, steroidal glikozitler ve nişasta<sup>22</sup>; toprak üstü kısımlarında ise alkaloid (fenantroindolizidin alkaloidler), flavonoid, kardiyoaktif glikozitler ve şeker<sup>21</sup> bulunduğu tespit edilmiştir. Literatür taramaları polisakaritler, steroller<sup>29</sup>, flavonoidler, fenolik asitler, alkaloidler, tanenler, saponinler, terpenler ve uçucu yağların<sup>35,36</sup> antimikrobiyal özelliklerinin olduğunu göstermiştir. Etanol, geniş aralıkta polar bileşikleri çözen<sup>37</sup>; fenolikler, alkaloidler, steroller ve terpenler<sup>36</sup> için uygun bir çözücüdür. Bu durum, çalışmamızda etanol ekstraktlarının neden daha etkili olduğunu da açıklamaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada *Vincetoxicum* cinsine ait tohumlar ilk kez araştırılmıştır. Sonuçlar *V. canescens* subsp. *canescens* ve *V. canescens* subsp. *pedunculata* tohumlarının tıbbi potansiyeli olduğunu göstermektedir. Bu durum iki taksonun ileri araştırmalarla farklı mikroorganizmalar ve çeşitli kanser hücre dizilerine karşı detaylı incelenmesinin ve ayrıca gelecekte *Vincetoxicum* cinsine ait diğer türlerin

tohumlarının da araştırılmasının yolunu açmaktadır. Dahası ileri aşamada etkiden sorumlu bileşikler, ekstre bileşik etkinliğinin karşılaştırılması, etki mekanizmaları, hayvan deneyleri ve toksisite testlerinin de yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Böylece, araştırmamızın bu bitkilerin enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyal ajan olarak ve çeşitli kanser türlerine karşı antiproliferatif ajan olarak kullanımlarının uygun olup olmayacağına değerlendirilmesi için yeni araştırmalara öncülük edeceği düşünülmektedir.

## BİLGİ

Bitki örneklerinin teşhisinde katkılarından dolayı Dr. Ahmet İlçim'e (Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Mustafa Kemal Üniversitesi) teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

1. Paşca C, et al. Medicinal plants based products tested on pathogens isolated from Mastitis Milk. *Molecules* 2017;22:1473-1489.
2. Siddiqui W, et al. Antimicrobial properties of teas and their extracts *in vitro*. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016;56(9):1428-1439.
3. Ngezahayo J, et al. *In vitro* study of five herbs used against microbial infections in Burundi. *Phytother Res* 2017;31:1571-1578.
4. Guzel S, et al. Wound healing properties, antimicrobial and antioxidant activities of *Salvia kronenburgii* Rech. f. and *Salvia euphratica* Montbret, Aucher & Rech. f. var. *euphratica* on excision and incision wound models in diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2019;111:1260-1276.
5. Anadozie, SO, et al. *Bryophyllum pinnatum* inhibits arginase II activity and prevents oxidative damage occasioned by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) in rats. *Biomed Pharmacother* 2018;101:8-13.
6. Leimu R. Variation in the mating system of *Vincetoxicum hirundinaria* (Asclepiadaceae) in peripheral island populations. *Ann Bot* 2004;93:107-113.
7. Liede S. *Cynanchum-Rhodostegiella-Vincetoxicum-Tylophora* (Asclepiadaceae): new considerations on an old problem. *Taxon* 1996;45:193-211.
8. Sliumpaite I, et al. Antioxidant properties and phenolic composition of swallow-wort (*Vincetoxicum lutea* L.) leaves. *Ind Crops Prod* 2013;45:74-82.
9. DiTommaso A, Lawlor FM, Darbyshire SJ. The biology of invasive alien plants in Canada 2. *Cynanchum rossicum* (Kleopow) Borhidi (= *Vincetoxicum rossicum* (Kleopow) Barbar.) and *Cynanchum louseae* (L.) Kartesz & Gandhi (= *Vincetoxicum nigrum* (L.) Moench). *Can J Plant Sci* 2004;85:243-263.
10. Mansoor A, et al. Antiprotozoal activities of *Vincetoxicum stocksii* and *Carum copticum*. *Bangladesh J Pharmacol* 2011;6:51-54.
11. Nowak R, Kisiel W. Hancokinol from *Vincetoxicum officinale*. *Fitoterapia* 2000;71:584-586.
12. Lavault M, Richomme P, Bruneton J. New phenantroindolizidine N-oxides alkaloids isolated from *Vincetoxicum hirundinaria*. *Medic. Pharm Acta Helv* 1994;68:225-227.
13. Coassini-Lokar L, Poldini L. Herbal remedies in the traditional medicine of the Venezia Giulia Region (North East Italy). *J Ethnopharmacol* 1988;22:231-278.
14. Baytop T. *Türkiye'de bitkiler ile tedavi geçmişte ve bugün. (İlaveli 2. Baskı), İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul; 1984.pp:372.*
15. Tuzlacı E, Dogan A. Turkish folk medicinal plants, IX: Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharm J* 2010;14:136-143.
16. Altundag E, Ozturk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia, Turkey. *Procedia Soc Behav Sci* 2011;19:756-777.
17. Staerk D, et al. *In vitro* cytotoxic activity of phenantroindolizidine alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum* and *Tylophora tanakae* against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *J Nat Prod* 2002;65:1299-1302.
18. Zaidi MA, Crow JSA. Biologically active traditional medicinal herbs from Balochistan, Pakistan *J Ethnopharmacol* 2005;96:331-334.
19. Guzel S, et al. Evaluation of antimicrobial activity of five *Vincetoxicum* taxa growing in Turkey. *Mamar Pharm J* 2018;22(3):365-373.
20. Guzel S, Ulger M, Kokdil G. Anti(myco)bacterial and antifungal activities of seed pods of four *Vincetoxicum* taxa growing in Turkey. *International Journal of Scientific and Technological Research* 2018;4(3):27-38.
21. Guzel S, et al. Phytochemical composition and antifeedant activity of five *Vincetoxicum* taxa against *Spodoptera littoralis* and *Leptinotarsa decemlineata*. *Mamar Pharm J* 2017;21(4):872-880.
22. Guzel S, Pavela R, Kokdil G. Phytochemistry and antifeedant activity of root extracts from some *Vincetoxicum* taxa against *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera littoralis*. *JBiopest* 2015;8(2):128-140.
23. Browicz K. *Vincetoxicum* N.M. Wolf. In: Davis, P.H. (Eds), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol 6, Edinburgh; 1978.pp:163-173.
24. Guzel S, Pavela R, Kokdil G. Evaluation of antifungal effect of different polarity extracts from five *Vincetoxicum* taxa against *Aspergillus fumigatus*. *International Anatolian Academic Online Journal/Health Science* 2015;3(2): 1-9.



25. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, second ed. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4); Wayne; Pennsylvania; 2002.
26. Yumrutas O, et al. Association between anti-proliferative activity of *Evernia prunastri* with the cellular apoptotic pathway. Cumhuriyet Sci J 2017;38(3):516-524.
27. Bazzaz F, Haririzadeh G. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharm Biol 2003;41(8):573-583.
28. Mogg C, et al. Test of the antibiotic properties of the invasive vine *Vincetoxicum rossicum* against bacteria, fungi and insects. Biochem Syst Ecol 2008;36:383-391.
29. Bajpai VK. Antimicrobial bioactive compounds from marine algae: a mini review. Indian J Geomarine Sci 2016;45(9):1076-1085.
30. Alimpić A, et al. Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. Ind Crops Prod 2017;105:1-9.
31. Lean SS, Yeo CC. Small, enigmatic plasmids of the nosocomial pathogen, *Acinetobacter baumannii*: good, bad, who knows? Front Microbiol 2017;8:1547-1555.
32. Shamsizadeh Z, et al. Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of *Acinetobacter* infections. Environ Health Prev Med 2017;22(44):1-7.
33. Sak K, et al. Cytotoxic action of methylquercetins in human lung adenocarcinoma cells. Oncol Lett 2018;15:1973-1978.
34. Staerk D, et al. Cytotoxic activity of some phenanthroindolizidine *N*-oxide alkaloids from *Cynanchum vincetoxicum*. J Nat Prod 2000;63:1584-1586.
35. Arif T, Mandal TK, Dabur R. 9. *Natural products: Anti-fungal agents derived from plants*. In: Mishra, B.B. (Eds), Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry. Kerala; 2011.pp:283-311.
36. Cowan M.M. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999;12(4):564-582.
37. Kowalczyk D, et al. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. J Inst Brew 2013;119(3):103-110.