МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

Анелия Матева Василева

Структурно и биохимично охарактеризиране на хлорогенни киселини, изолирани от *Tanacetum vulgare* L. (вратига) като потенциални противотуморни агенти

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

4. Природни науки, математика и информатика
Професионално направление 4.3. Биологически науки
Докторска програма БИОХИМИЯ

Научни ръководители:
Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн
доц. д-р Ивайло Иванов, дх

София, 2019 г.

Съдържание

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ 3
1. ВЪВЕДЕНИЕ 5
2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 6
2.1. Протеолитични ензими, маркерни за патологични процеси 7
2.2. Полифенолни съединения 13
2.3. *Tanacetum vulgare* L. 23
3.ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ 30
3.1 Цели 30
3.2 Задачи 30
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 31
4.1. Материали 31
4.2. Методи 32
5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ 36
5.1. Екстракти и фракции от вратига 36
5.2. Определяне на химичния състав на екстрактите и фракциите от вратига 38
5.3 Антитуморна активност 48
5.4 Инхибиране на постпролин-специфична ензимна активност 52
6. ИЗВОДИ 59
7. ПРИНОСИ 60
8. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД 61
8.1 Научни публикации по темата на дисертацията: 61
8.2 Участия в научни форуми във връзка с темата на дисертацията: 61
8.3 Участия в проекти във връзка с дисертационния труд: 62
9. БИБЛИОГРАФИЯ 63

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

T.vulgare L.	Вратига
CQA	(1-, 3-, 4- и 5-) монокафеоилхинови киселини
DCQA; diCQA	(1,3-, 1,4-, 1,5-, 3,4-, 3,5- и 4,5) дикафеоилхинови киселини
triCQA	(1,3,4-, 1,3-, 5-, 1,4,5- и 3,4,5-) трикафеолхинови киселини
CA	Кафеена киселина
CGA	Хлорогенна киселина
FQA	Феруоилхинови киселини
pCoQA	пара-Кумароилхинова киселина
DPP IV; DPP4	Дипептидилпептидаза IV (EC 3.4.14.5)
α FAP; FAP-α	Фибробласт активиращ протеин алфа (EC 3.4.21.B28)
POP; PREP	Пролилолигопептидаза (EC 3.4.21.26); Пролилендопептидаза
MCF10A	Клетъчна линия от нормален имортализиран епител на млечна жлеза
MCF7	Клетъчна линия от луминален карцином тип А на млечна жлеза
MDA-MB-231	Клетъчна линия от тройно негативен карцином на млечна жлеза
H1299	Клетъчна линия от недребноклетъчен карцином на бял дроб
A549	Клетъчна линия от дребноклетъчен карцином на бял дроб
HeLa	Клетъчна линия от карцином на маточна шийка
PC3	Клетъчна линия от аденокарцином на простата
HepG2	Клетъчна линия от добре диференциран хепатоцелуларен карцином (рак на черния дроб)
HT29	Клетъчна линия от колоректален аденокарцином (рак на дебелото черво)
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2 (рецептор 2 за човешки епидермален растежен фактор)
EACE	Етилацетатна фракция от суров екстракт на вратига
DCHAS	Фракция от дициклохексиламониеви соли на вратига
DEHS	Твърдо вещество от диетилов етер/хексан на вратига
EAFT	Етилацетатна фракция от цвета на вратига
IC_{50}	Half Maximal Inhibitory Concentration (инхибиторна концентрация 50%)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
FBS	Fetal Bovine Serum (фетален телешки серум)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (хранителна среда)
ROS	Реактивни кислородни видове
Bcl-2	В-клетъчен лимфом 2, кодиран в хора от гена Bcl 2 (семейство регулаторни протеини)
Bcl-xL	В-клетъчен лимфом-екстра-голям, кодиран от гена Bcl 2 (семейство регулаторни протеини)
MMP	Матрични металопротеинази
RKO	Човешки епител от карцином на дебелото черво
CT26	Миши фибробласти от карцином на дебелото черво

LPS	Липополизахариди
RAW 264.7	Миши макрофаги трансформирани с левкимичен вирус на Abelson
A2780	Човешка клетъчна линия от карцином на яйчниците
EGCG	(-) Епигалокатехин 3- галат
EGC	(-) Епигалокатехин
ECG	(-) Епикатехин галат
EC	Епикатехин
LC-MS	Високоефективна течна хроматография и масспектрометрия
NMR	Спектроскопия с ядрено-магнитен резонанс
HRMS	Масспектрометрия с висока резолюция
LC-HRMS	Течна хроматография/масспектрометрия с висока разделителна способност
UHPLC	Ултра-високоефективна течна хроматография

1. ВЪВЕДЕНИЕ

В днешно време, особено през последното десетилетие, лечебните растения заемат все по-значимо място в лечението и профилактиката на редица заболявания – самостоятелно или като допълнителни средства към конвенционалната терапия. Благодарение на съдържащите се в тях биологично активни вещества те оказват полезно въздействие върху различни патологично променени функции на организма при болестни процеси. Съществена причина за рязкото нарастване на интереса към лечебните средства от растителен произход е това, че с блестящото развитие на съвременната медицина и фармация се създават голям брой силно активни лекарства, на които обаче са присъщи и множество твърде опасни, нежелани ефекти. Това обръща погледа на човечеството към перспективата растителни лекарства, които благодарение на биологичната си природа са по-добре поносими от човешкия организъм, съчетавайки широкоспектърно терапевтично действие и относителната безопасност. Макар и да са с естествен произход, някои от тези продукти могат да са вредни за здравето. Фармацевтичната индустрия проявява нарастващ интерес към разработването и производството на фитопродукти като билкови лекарства, етерични масла, тинктури, таблетки и капсули. Определянето на автентичността и концентрацията на активните вещества в лечебните растителни суровини и фитопрепаратите е сложен аналитичен проблем поради многокомпонентния им състав [1]. Разработването на натурални продукти се превърна във важен фактор в много производствени области, включително за храни, хранителни добавки, козметика, биологично земеделие, санитарни и хигиенни стоки.

Значителното многообразие и ценни биологични свойства на българските лечебни растения предоставят големи възможности относно инхибиране растежа на туморните клетки, без да вредят на организма. Във връзка с това дисертационният труд има за цел да обогати наличните данни относно терапевтичните възможности на растителните ресурси чрез проучване на антитуморната активност на *Tanacetum vulgare* L. (вратига).

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

В световен мащаб ракът е заболяване с огромно въздействие и тежест върху обществото и е свързано с висок процент на смъртност. Световната здравна организация прогнозира значително увеличаване на броя на новите ракови заболявания годишно до 2025 г. поради нарастването и застаряването на населението [2].

На молекулярно ниво канцерогенезата представлява смущение във функцията и/или в взаимодействията между отделни гени и техните протеинови продукти. В нормалните клетки, прогресията на клетъчния цикъл е под строг контрол, докато при раковите клетки, като правило, процесът е анормален или има нарушено регулиране. Развитието на рака е свързано с анормална пролиферация на трансформирани клетки и/или инхибиране на клетъчни апоптотични пътища. През последните десетилетия многобройни проучвания разкриват, че заедно с химиотерапевтиците и лъчевата терапия, лечебните растения могат също да повлияят на функцията на гени, ангажирани в контрола на клетъчната пролиферация и програмирана клетъчна смърт, като по този начин възпрепятстват прогресията на неконтролиран клетъчен цикъл и активират апоптозата.

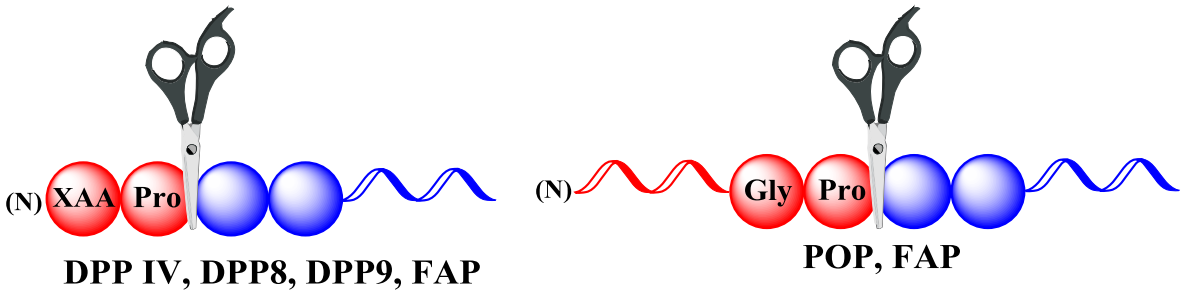
Ракът на млечната жлеза, яйчниците и маточната шийка са сред най-често диагностицираните и причиняващи най-висока смъртност злокачествени заболявания при жените, както в световен мащаб, така и за България. Поради сложната природа на рака и силната вариабилност при отделните случаи, универсална ефективна терапия липсва. Затова значителни усилия са насочени към хемопревенцията като алтернативен подход за контрол на рака [3]. Налице е огромна необходимост от откриване и въвеждане в практиката на нови терапевтични възможности с по-висока ефективност и по-ниска токсичност от съществуващите. През последните десетилетия природните продукти с растителен произход доминират сред източниците на нови профилактични и терапевтични средства. За повече от 3000 растителни вида е известно, че повлияват онкологичния процес, а редица антинеопластични агенти с растителен произход вече успешно се прилагат в клиничната практика. Все още обаче онкотерапевтичният потенциал на по-голямата част от растителните видове остава непроучен. Необходима е обаче по-подробна информация за точните механизми, стоящи в основата на антитуморната активност на специфичните билки.

Тенденцията за прилагане на общи растителни екстракти или комбинация от различни фитохимикали при профилактиката и лечението на онкологични заболявания се основава на синергичните ефекти на различните растителни метаболити, както и на множествените цели, върху които екстрактите могат да се отразят [4]. Интересът е насочен към откриването на агенти с растителен произход, които избирателно да инхибират растежа на туморните клетки, без да вредят на организма. Уточняването на точните механизми на действие на антитуморните агенти е от съществена необходимост за успешното им внедряване в клиничната практика. Значителното многообразие и ценни биологични свойства на българските лечебни растения предоставят големи възможности в тази посока.

2.1. Протеолитични ензими, маркерни за патологични процеси

Растенията произвеждат широка гама биоактивни съединения чрез вторичния си метаболизъм. Тези съединения могат да предизвикат голям брой различни ефекти върху хората и животните. Напоследък нараства интересът към вещества от естествен произход, които са селективни инхибитори на ензими. Протеазите се считат за привлекателни терапевтични мишени. Изследванията за идентифициране на протеолитични ензими, маркерни за патологични процеси, могат да доведат до разработването на нови средства за терапия с висока ефективност и добра биологична поносимост. Въз основа на проучвания на разтворими и мембранно-свързани протеази са разработени различни медикаменти, които са одобрени за лечение на редица заболявания при хората.

Постпролиновите протеази представляват подгрупа от серинови протеази, участващи в регулирането на много сигнални пътища и са обещаващи терапевтични цели за разпространени заболявания като диабет и рак. Хидролизата на пептиди и белтъци при пролинов остатък се осъществява от малко на брой пролин-специфични протеази.Тази протеазна подгрупа принадлежи към семейството S9 на серин пептидази и включва разнообразни и важни ензими. От известните човешки протеази са описани само няколко такива ензима, например дипептидилпептидаза IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) [5], DPP8, DPP9, фибробласт активиращ протеин α (FAP, EC 3.4.21.B28) [6], и пролилолигопептидаза (POP, пролилендопептидаза, EC 3.4.21.26) [7]. Те са серинови протеази и проявяват сходства в своето каталитично поведение. Ензимите DPP-IV и FAP са мембранно-свързани, докато POP, DPP8 и DPP9 са цитозолни. От тях DPP-IV, FAP, DPP8 и DPP9 са екзопептидази, а POP и FAP са ендопептидази (Фиг. 1).



Екзопептидазна активност *Ендопептидазна активност*

Фигура 1. Екзо- и ендопептидазна активност на постпролин-специфични протеази.

Биосинтезът на богати на пролин протеини (колагени от различен тип и др.) и отделянето им в извънклетъчния матрикс се извършва от активирани фибробласти. Предполага се, че постпролин-специфични протеази участват в патологични процеси чрез разграждане на пролин-съдържащи пептиди от извънклетъчната среда, при което се освобождават различни биологично активни пептиди, растежни фактори и др. Това води до болестни състояния като фибрози, възпаления и/или неоплазии [8]. Протеолитичните ензими играят важна роля в патофизиологията на

белодробните заболявания и биха могли да се използват като биомаркери. Изследвана е експресията на постпролин-специфичните пептидази (DPP IV, FAP и POP) при белодробни заболявания в сравнение с нормата [9]. Основната роля на тези протеази при много заболявания е причина за значителния интерес към биологичната им роля и потенциала им като мишени за терапия [10]. Въпреки, че са направени редица фундаментални изследвания, в много случаи тяхната точна роля за възникването и прогресията на заболявания като рак, диабет, артрити и др., остава неизяснена. Факта, че повишените нива на активност на тези ензими се наблюдават при различни патологични състояния, включително злокачествени заболявания, прави техните инхибитори потенциални терапевтични средства.

2.1.1. Фибробласт активиращ протеин α

Фибробласт активиращият протеин α (FAP, EC 3.4.21.B28) принадлежи към S9b-семейството на сериновите интегрални мембранни протеази. Активният ензим представлява 170 kDa хомодимер, съдържащ две N-гликозилирани 97 kDa субединици. Ензимът хидролизира пролин съдържащи пептиди и макромолекули, като променя тяхната клетъчна функция. Четири невропептида ефективно се разграждат от FAP: невропептид Y, пептид YY, B-тип натриуретичен пептид и субстанция P. Невропептид Y и фибробласт разтежният фактор-21 са in vivo субстрати за ензима.

Експресията на този ензим е свързана с инвазивността на човешките меланомни и карциномни клетки, свързва се с фибрози, възпаления и онкологични заболявания, но протеинът е неоткриваем в повечето нормални възрастни тъкани [8]. Ензимът селективно се експресира в местата на ремоделиране и възстановяване на нормални тъкани, както и в стромата на прогресиращи солидни тумори, което предполага, че тази протеаза може да бъде терапевтична цел за лечение на болестни състояния, свързани с фиброзна дисрегулация [11]. Високи нива на FAP-активност са асоциирани с висока инвазивност при множество малигнено-трансформирани клетки. Ензимът благоприятства растежа и пролиферацията на туморните клетки [11]. FAP представлява туморен промотор [9] способстващ протуморогенните функции на различни клетъчни видове, включително пролиферацията и подвижността на мезенхимни, туморни и имунни клетки [12]. Ракът на стомаха е третата водеща причина за смъртността от рак в света. Установено е, че FAP-α експресията е значително повишена в пробите от рак на стомаха. Повишените нива на FAP-α експресията корелират с неблагоприятни клинично-патологични характеристики, като дифузен хистологичен подтип, напреднал патологичен стадий и лоша преживяемост. FAP-α регулирането е свързано с активиране на биологични процеси, включени в туморната прогресия, включително клетъчна миграция и пътища на ангиогенеза. Тези наблюдения подчертават възможната прогностична значимост на FAP-а при рак на стомаха и неговия потенциал като нов биомаркер за медицината [13, 14]. В зависимост от конкретните видове неоплазии и етапа на развитие на заболяването, FAP освен като като туморен промотор, може да се явява и туморен супресор [9]. FAP също така се експресира при заболявания свързани с

активация на стромата [13], като ревматоиден артрит [11], цироза и белодробна фиброза. Ензимната активност на FAP представлява потенциално важна стратегия за диагностика, прогнозиране и терапия на онкологични заболявания [9, 15].
Повече от 90% от туморите съдържат FAP-позитивни активирани фибробласти. FAP практически липсва в нормалните тъкани, но присъства в ембрионални и туморни тъкани, което го прави селективна и универсална цел. Разглеждат се основните подходи за въздействие върху туморните фибробласти чрез моделиране активността на FAP [16, 17].
Основна пречка при изследване ензимната активност на FAP е липсата на селективни инхибитори на тази протеаза. FAP, притежава екзопептидазна специфичност подобно на членовете на DPP IV семейството, както и ендопептидазна специфичност, подобна на тази на пролил ендопептидазата (POP).
Пространствените структури на FAP и DPP IV са почти идентични (Фигура 2), като има голямо сходство и в строежа на активните им центрове.
Разработването на ефективни селективни FAP инхибитори също така ще е полезно и за изучаването на биологичните роли на този белтък [18].

2.1.2. Дипептидилпептидаза IV

Дипептидилпептидаза IV (DPP IV, EC 3.4.14.5) е член на пролилолигопептидазното семейство на сериновите протеази [19]. Ензимът отделя Xaa-Pro дипептиди от N-края на олиго- и полипептиди.
В нативно състояние мономерите на DPP IV асоциират и формират хомодимери. В това взаимодействие участват и двата извънклетъчни домена [20]. DPP IV се експресира в много видове тъкани при бозайниците. Чрез изоелектрично фокусиране е установена голяма молекулна хетерогенност на DPP IV, но е открита само един тип иРНК [21]. Въпреки, че естествените субстрати на DPP IV не са дефинирани окончателно, съществува голям списък от теоретично възможни субстрати. Сравняването на N-крайните секвенции на различни пептиди и белтъци показва, че значителен брой цитокини, невропептиди и растежни фактори притежават консервативен X-Pro мотив в N-края си. Освен че има значение за вторичната структура и следователно в много случаи за биологичната активност на тези молекули, N-крайната X-Pro секвенция служи и за предпазване от неспецифично протеолитично разграждане, аналогично на C-крайното амидиране или ацетилиране [22]. Субстратната специфичност на DPP IV зависи и от свързването ù с други белтъци, които променят достъпността на активния ù център. Поради това различните изоформи на DPP IV могат да имат различна субстратна специфичност и е много трудно да се предскаже кои естествени субстрати са предпочитани от тях [23]. Много от членовете на глюкагоновото семейство са субстрати за DPP IV.
DPP IV играе важна роля в поддържането на глюкозната хомеостаза чрез контролиране на активността на инкретините - глюкагон-подобен пептид-1 (GLP1) и глюкозозависим инсулинотропен полипептид (GIP). Най-често използваните

лекарствени субстанции при терапията на диабет тип II са инхибитори на DPP IV. Също така отстранява дипептидите последователно от N-краищата на глюкагон и прокалцитонин [24].

Счита се, че DPP IV (CD26) е активиращ фактор на повърхността на човешките Т-лимфоцити и играе ключова роля в регулирането на пролиферацията и диференциацията на лимфоцитите [23], включително производството на лимфокини [25]. Изследвания със специфични инхибитори на ензима предполагат, че DPP IV допринася за активирането на Т-клетките чрез неговата активност на дипептидил-пептидазата [26]. DPP IV участва в развитието на някои неоплазии. Тя се свръхекспресира при някои агресивни Т-клетъчни малигнени трансформации, хронична В лимфоцитна левкемия и тироидна карцинома [27]. Високата експресия на DPP IV е приета като маркер за някои по-агресивни Т-клетъчни лимфоми, както и за хронична В-лимфоцитна левкемия [28]. Освен като маркер за някои малигнени трансформации (аденокарцином на щитовидната жлеза, агресивни Т-клетъчни лимфоми и др.) се предполага, че DPP IV може да служи и като маркер за специфичен Т-клетъчен отговор при автоимунни и възпалителни заболявания като ревматоиден артрит и мултитиплена склероза. Намаляване на серумната DPP IV-активност се наблюдава при пациенти, страдащи от възпаления на червата. Това би могло да се използва при проследяването на пациентите, за да се прецизира диагностиката им. Доказано е, че наднорменото тегло е свързано с увеличена активност на DPP IV [28].

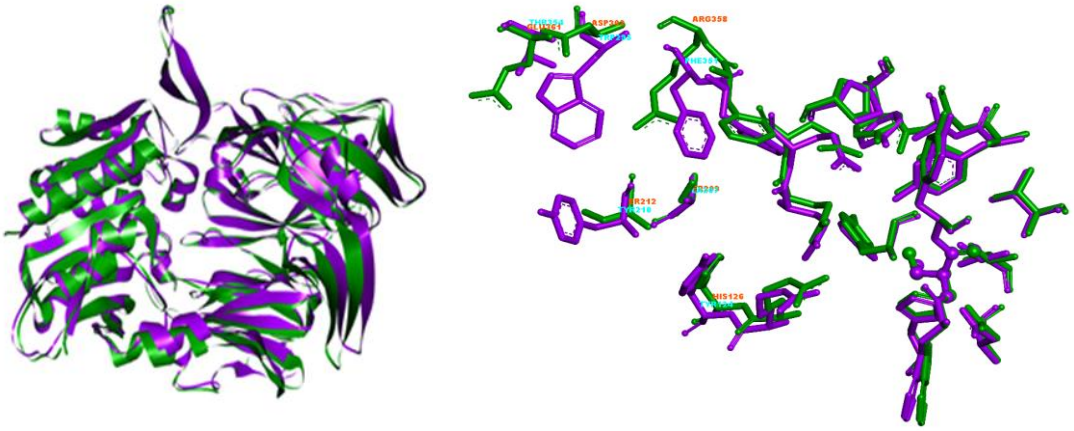
Наскоро DPP IV се превърна в цел за проектиране на лекарства и това доведе до откриването на нови инхибитори [29, 5].

Дипептидил пептидазата и сродните протеини съдържат както мембранно-свързани, така и разтворими членове и обхващат широк спектър от модели на експресия, тъканни разпределения и компартментализация. Тези протеини имат важна роля в регулирането на сигнализирането от пептидните хормони и са мишени за диабет, онкология и други показания. Ензимът играе важна роля в туморната прогресия при някои видове рак [10].

2.1.3. Структура на DPP IV и FAP

Дипептидил пептидаза IV и фибробласт активиращ протеин α, както бе отбелязано са серинови протеинази, членове на S9b-олигопептидазното семейство, като и двата ензима са мембранно свързани гликопротеини, които в нативно състояние формират хомодимери. Те хидролизират полипептидни субстрати с Pro в позиция P_1, като и двата ензима притежават екзопептидазна активност, а само FAP има и ендопептидазна активност. FAP показва до 52% хомология с DPP IV, но третичната им структура е почти идентична, което се отнася и до структурата на активните им центрове.

A B



Фигура 2. Пространствени структури на FAP (PDB ID: 1Z68), представени във виолетово, и на DPP IV (PDB ID: 1NU8), изобразени в зелено (A), и насложените структури на активните им центрове, като са отбелязани аминокиселините, по които се различават (B).

2.1.4. Пролилолигопептидаза

Пролил олигопептидаза (POP, EC 3.4.1.26) е 80 kDa серинова пептидаза (семейство S9, клан SC), която хидролизира пост-пролинови пептидни връзки в пептиди с дължина <30 аминокиселини [30]. Пролил олигопептидаза специфично разцепва Pro ↓ Xaa връзки в биологично активни пептиди като субстанция P, окситоцин, вазопресин, гонадолиберин, брадикинин, невротензин, ангиотензин II, тиротропин-освобождаващ хормон, лутеинизиращ освобождаващ хормон, стимулиращ α-меланоцитите хормон и динорфин. Въпреки това, по-големите молекули на денатуриран казеин, колаген, гастрин и адренокортикотропин-освобождаващ хормон не се хидролизират. Ензимът също хидролизира -Xaa-Ala-, -Xaa-(N-метил)аланин- и -Xaa-Ser-връзки [31, 7]. Това предполага, че ензимът също така разпознава аминокиселинната странична верига, която се попада в пространството, съответстващо на пролинния пръстен.

Пролилолигопептидазата (POP) участва в процесите на диференциация, развитие и пролиферация на различни тъкани. Предполага се, че ензимът играе важна роля в модулиране на нивата на няколко невропептиди и хормони, съдържащи пролинов остатък. Установено е, че пролилолигопептидазните ензими играят важна роля за паметта и други неврологични процеси [32] или се свързват със заболявания като амнезия, депресия, шизофрения, диабет, трипанозомиаза. Нивата на POP активност, се увеличават при пациенти с мания и шизофрения, както и при високо кръвно налягане [33]. Поради своята физиологична роля в клетъчните сигнализационни пътища, инхибирането на POP предлага подход за лечение на болестите на Алцхаймер и Паркинсон, както и други заболявания, свързани с когнитивно увреждане [34]. Научни експерименти показват, че baicalin е пролекарство, способно да инхибира пролиолигопептидаза, даващо възможност за да се

разработят нови лечения на шизофрения, биполярно афективно разстройство и свързани невропсихиатрични заболявания [35].

Въпреки че POP може директно да контролира нивата на невропептидите, нови данни сочат, че тази пептидаза модулира пептиди, които от своя страна регулират възпалителните реакции [36]. Проучвания показват повишена експресия и активност на този цитозолен ензим при много видове рак, включително рак на гърдата. Специфични инхибитори на ензима блокират клетъчния растеж на раковите клетки при карцином на млечна жлеза [30]. Специфичните за POP-инхибиторите могат да бъдат ефективно лечение срещу ER+ и ER- рак на гърдата [30]. В допълнение , инхибирането на POP потиска растежа на NB-1 човешки клетки от невробластоми и човешки стомашни ракови клетки.

Синтезът или намирането на природни специфични инхибитори за пролилолигопептидазите, ще бъдат полезни за определяне на физиологичните и патологичните роли на тези ензими и са потенцален терапевтичен и фармацевтичен интерес [33]. Двете постпролилендопептидази, FAP и POP, обикновено са свръхекспресирани при епителни злокачествени заболявания. Въпреки свръхекспресията в повечето видове рак и ролята им в ангиогенезата, инхибирането на активността на пролилолигопептидазата се отделя малко внимание като подход за подтискане на туморния растеж. Експерименти са установили, че едновременното инхибиране на двата ензима е по-ефективно, отколкото инхибиране на всеки от тях. Намалената ангиогенеза и съпътстващото дълбоко намаляване на туморния растеж предполагат, че инхибирането на FAP или POP може да предложи нови терапевтични подходи, които са насочени директно към туморните микросреди [37].

2.1.5. Селективни инхибитори

Постпролин-специфичните протеази DPP IV, FAP и POP играят важна или ключова роля при много заболявания, което провокира интереса към намирането или създаването на селективни инхибитори за тях. Основният проблем е, че те имат близки по структура активни центрове, а каталитичните им центрове са с еднаква пространствена структура и организация. Двата най-добре проучени членове на олигопептидазното семейството, DPP IV и FAP, са изследвани както като терапевтични цели за заболявания (селективни инхибитори на DPP IV се използват в медицинската практика при лечение на диабет тип II), така и като диагностични биомаркери. Освен това те са привлекателни серологични маркери при автоимунно заболяване, възпаление на червата, психосоматични разстройства и злокачествени заболявания [9].

Инхибиторите на FAP и POP все още не са преминали през клинични изпитвания, поради липса на достатъчно данни от фармакокинетиката, фармакодинамиката, биологичната приложимост и токсикологията, както и тяхната селективност.

2.2. Полифенолни съединения

Полифенолите са съединения, които имат повече от една фенолна хидроксилна група, свързана към един или повече бензенови пръстени. От гледна точка на структура и реактивоспособност, полифенолите включват полихидрокси-ароматни съединения с няколко фенолни звена или полихидроксиарематини съединения. Фенолните съединения са характерни за растенията и като група те обикновено се намират като естери или гликозиди, а не като свободни съединения.

Полифенолите са голяма група вторични растителни метаболити и се произвеждат от растенията като отговор на различни фактори на околната среда (светлина, охлаждане, замърсяване и др.). Те защитават хлоропластите от фоторазграждане чрез абсорбиране на високоенергийни кванти, като реагират със свободните радикали и реактивните кислородни видове (ROS) [38, 39]. Фенолните съединения осигуряват защита срещу вредните ефекти от UV-светлина и срещу патогенни атаки на насекоми, като те са известни като предварително формирани антимикробни метаболити. Такива предварително оформени съединения са част от механизъм за пасивна устойчивост. Като цяло, тези метаболити са токсични за широк спектър от гъби и бактерии, но съединенията имат относително ниско ниво на токсичност за други организми [39]. Така получените съединения присъстват във всички растителни видове и помагат на растенията да се предпазят от патогени, които не се считат за силно агресивни организми.

2.2.1. Биологична активност на полифеноли

От древни времена природните полифенолни съединения са използвани в традиционната медицина. Тази група вещества се характеризира с доказани противовъзпалителни, противоалергични, противовирусни и антимикробни свойства, като потенциал за превенция на някои сърдечно-съдови заболявания, хипертония, диабет тип 2, различни видове рак и и най-вече действието им като антиоксиданти. Много фенолни съединения, се продават като лекарства за лечение на рак, вирусни и протозойни инфекции, астма и заболявания, свързани с централната нервна система. Някои от тях са в клинично изпитване, а някои се използват официално като суров екстракт.

Полифенолите проявяват своя положителен ефект върху човешкото здравето чрез няколко механизма – предпазване от свободни радикали, защита и регенериране на други налични в антиоксиданти (напр. витамин Е), хелатираща способност към прооксидантни метали. Те притежават също имуномодулаторно действие, проти-воракова и антибактериална активност [40].

През последните години поради благоприятните ефекти върху човешкото здраве на фенолните съединения, биват често изследвани. Специален интерес се отдава на терапевтичната роля на естествените антиоксиданти, като например фитохимикалите, налични в медицински и диетични растения, които могат да

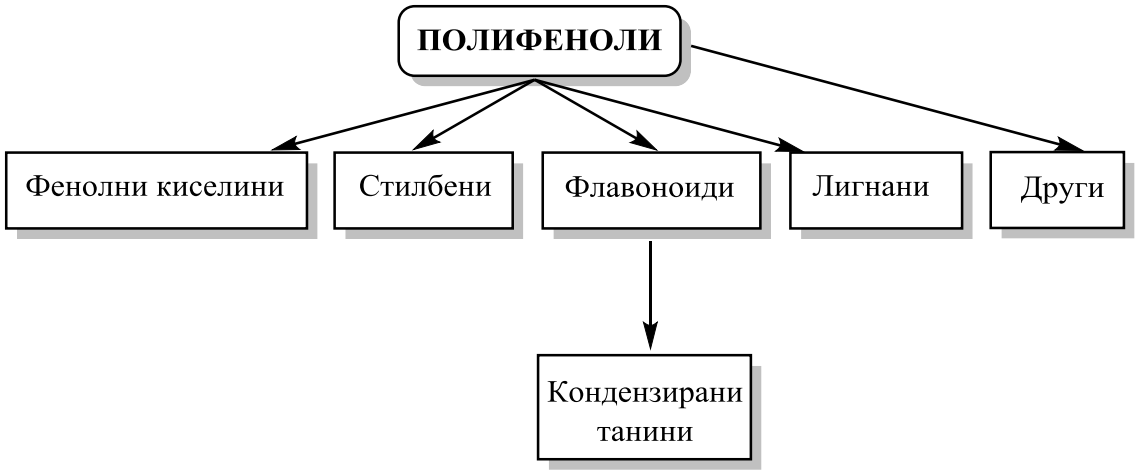
помогнат за предотвратяване на оксидативно увреждане [39]. Антиоксидантната активност на фенолните съединения е свързана с тяхната химическа структура, която им придава силни редукционни свойства. Те могат да играят важна роля в адсорбирането и неутрализирането на реактивните кислородни видове (ROS), както и при разлагането на пероксидите. ROS, получени при окислителните процеси, са важна част от механизмите за защита срещу инфекция, но прекомерното генериране на свободни радикали може да увреди тъканите [40]. Доказано е, че с увеличаване броя на хидроксилните групи на флаваноидите и фенолните киселини се увеличава антиоксидантната активност и намалява с гликолизирането поради намаляване активността на агликона, вероятно поради пространствено пречене в следстие добавянето на захарната част [41]. Когато съществува дисбаланс между ROS и антиоксидантните защитни механизми се появява риск от попадане в състояние на оксидативен стрес. Доказано е, че той е пряко свързан с проява на заболявания като рак, стареене, атеросклероза, възпаление и невродегенеративни заболявания като болестта на Паркинсон и болестта на Алцхаймер [42, 43]. Поради това антиоксидантните фенолни съединения се считат за надеждни защитни агенти, които намаляват оксидативните увреждания от ROS в човешкото тяло, в следствие на което се забавя прогресирането на много хронични заболявания [44].



Фигура 3. Здравословни ефекти на полифенолите.

2.2.2. Класификация на полифенолите

Тези съединения могат да бъдат класифицирани в различни групи като функция от броя на фенолните пръстени, които те съдържат и от структурните елементи, които свързват тези пръстени един с друг. Така се правят различия между фенолните киселини, флавоноидите, стилбените и лигнаните (Фиг.4) [45, 46].



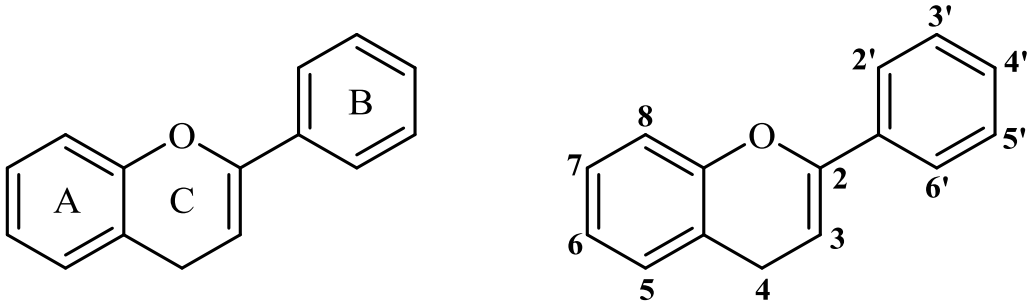
Фигура 4. Класификация на полифеноли.

Въз основа на общия брой и подреждане на изграждащите ги въглеродни атоми могат да се разделят на флавоноиди и нефлавоноиди. Флавоноидите са голяма група вещества като флавоноли, флавони, флаван-3-оли, антоцианидини, флаванони, изофлавони и др. Нефлавоноиди са фенолните киселини, хидроксицинамати, стилбени и др. [46].

Обикновено тези вещества се срещат свързани със захари и органични киселини. Най-широко разпространените фенолни съединения са фенолните киселини, флавоноидите и танините [39].

2.2.3. Флавоноиди

Флавоноидите се характеризират с химична структура на фенилбензопиран (фенилхромен). Общата структура включва C15 (C6-C3-C6) скелет, свързан с хроманов пръстен (бензопиранова част) (Фиг. 5).

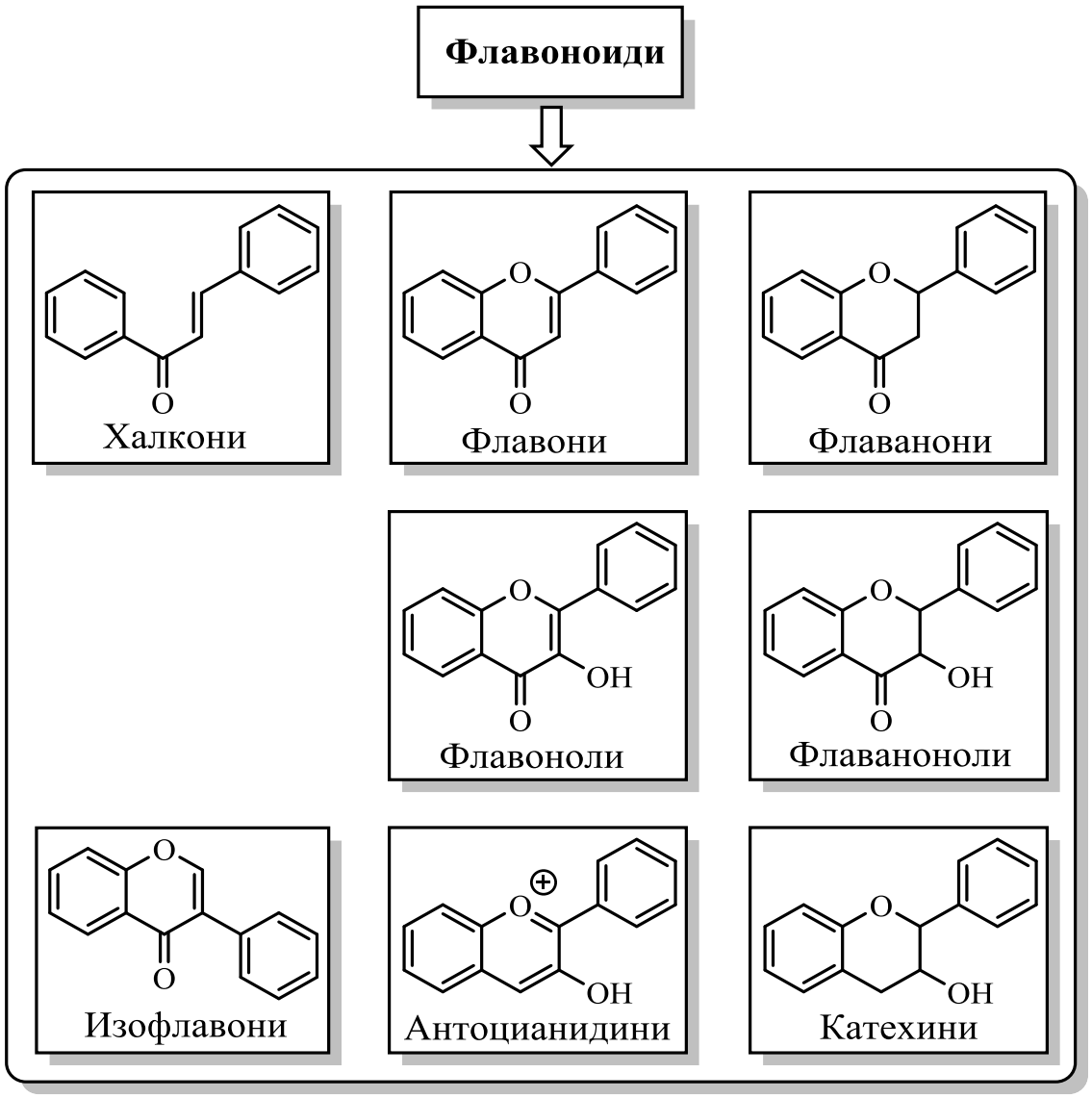


Фигура 5. Обща структура на флавоноиди.

Хетероцикленият пиранов пръстен е известен като С пръстен, кондензираният ароматен пръстен като А пръстен и фениловата съставна част като В пръстен. Пръстенът А може да бъде от два вида: тип резорцинол или флороглуцинол. Пръстенът В може да бъде и орто-дихидроксилиран или пирогалолов тип.

Централният хетероцикъл най-често съществува в една от трите форми: пиран, γ-пирон или пирилий.

Класификацията на флавоноидите е основана на различията в структурите трите въглеродни атома, обазначени на фигура 5 с номера 2, 3 и 4. Отличителна характеристика на тази група атоми е възможността за присъствие на двойна или единична връзки, наличие на карбонилна или хидроксилна групи. Освен това, ароматият пръстен може да бъде свързан с C3-атома. Класификацията на флавоноидите е представена фигура 6. С пръстените A и C са свързани с една, две или три хидроксилни групи, като някои от тях могат да са метилирани, гликозилирани или модифицирани с различни вещества. Класификацията на флавоноидите и молекулните скелети на базовите структури са представени на фигура 6.



Фигура 6. Класификация на флавоноидите. Представени са скелетите на молекулните структури на различните групи флавоноиди**.**

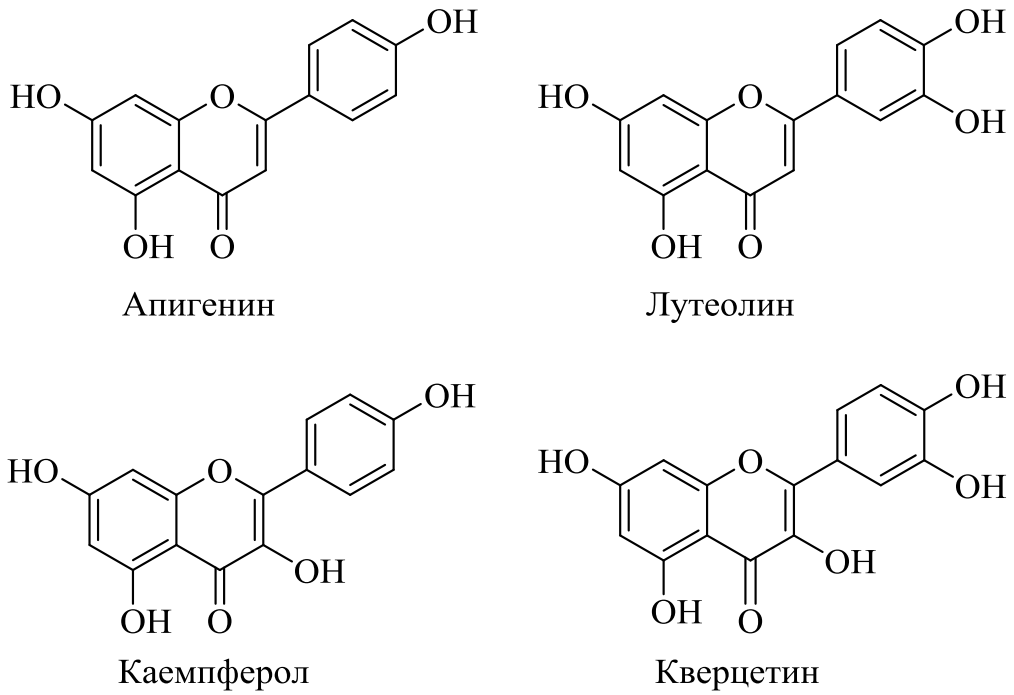
Флавоноидите са широко разпространени в природата, като флавоните и флаванолите са най-често срещаните техни представители. Намират се във високи концентрации в епидермиса на листата и плодовете. Участват в процеса на UV защита, на пигментация и устойчивост на заболявания [47, 48]. Основните флавоноиди, на които са богати повечето зеленолистни ядливи растения са съединенията - мирцетин, кемпферол, кверцетин, рутин, хиперозид, хесперидин, апигенин и лутеолин, които се срещат най-често под формата на О-гликозиди [49, 50].

Антоцианините са конюгирани със захарни остатъци антоцианидини и са от групата на цветните флавоноиди и сред най-важната група растителни пигменти. Химическата структура на антоцианина определя стабилността, интензитета на цвета и потенциалната биологична активност. Най-често срещаните антоцианини са пеларгонидин, цианидин, делфинидин, пеонидин, петунидин и малвидин.

2.2.4. Биологична активност на флавоноидите

Взаимодействията на флавоноидите с мембрани се появяват като важен механизъм, по отношение на биологичните им ефекти. Флавоноидите могат да взаимодействат с различни мембранни компоненти. Като последица от директното взаимодействие с мембранните липиди, флавоноидите могат да променят физичните свойства на мембраната, модулиращата ензимна активност, взаимодействията на лиганд-рецептора, йонните потоци, сигналната трансдукция, транспорта и други свързани с мембраната функции. Тези мембранно-флавоноидни взаимодействия могат да повлияят благоприятно върху степента на негативни процеси, например липидно окисление и мембранно разкъсване. Флавоноидите могат също така да взаимодействат с мембранните протеини и да променят тяхната биологична функция. Инхибирането на липидното (LH) окисление може да се счита за едно от най-много важни механизми за химическа реакция, които могат да обяснят антиоксидантната функция на флавоноидите [39]. Предполага се, че флавоноидите подобряват сърдечно-съдовото здраве и могат да спомогнат за предотвратяване на сърдечносъдовите заболявания чрез инхибиране на патогенни процеси като оксидативен стрес (липидна и протеинова пероксидация), възпаление, ендотелиална дисфункция и активиране на тромбоцитите. [39]. Позитивното въздействие на флавоноидите върху различните етапи на раковия процес, върху стимулирането на имунната система и върху хомеостазата в клетъчните системи е широко изследвано и описано [43]. Флавоноидите участват в широк набор от биологични функции. Някои от най-разпространените в природата и добре изучени флавоноиди са представени на фигура 7.

Кверцетинът, който е основен представител на флавонолите, проявява способност за предотвратяване окислението на LDL, при лечение на някои видове рак, атеросклероза и хронични възпаления [43, 46]. Кверцитина и 3-О-метилкверцетин са добри инхибитори за ацетилхолинестеразата [51].



Фигура 7. Структура на някои от най-разпространените в природата флавоноиди.

Изследвания доказват, че флавоноидите кемпферол и лутеолин проявяват максимална антипролиферативна активност и значителна ортокератоза, както и антипсориазна активност чрез инхибиране на кератиноцитната пролиферация. Така тези растителни флавоноиди могат да се използват като леснодостъпен източник на естествено антипсориазисно средство и могат да бъдат полезни при някои кожни проблеми [52]. Колагеназата е известен като член на матричните металопротеинази (MMP), които играят решаваща роля в нормалните физиологични процеси като ембриогенезата и аберантната експресия на MMP се свързва с много патологични аномалии като туморна инвазия. Инхибиторна активност на колагеназата и матричната металопротеиназа дават естери на хининовата киселина и кверцетин [53].

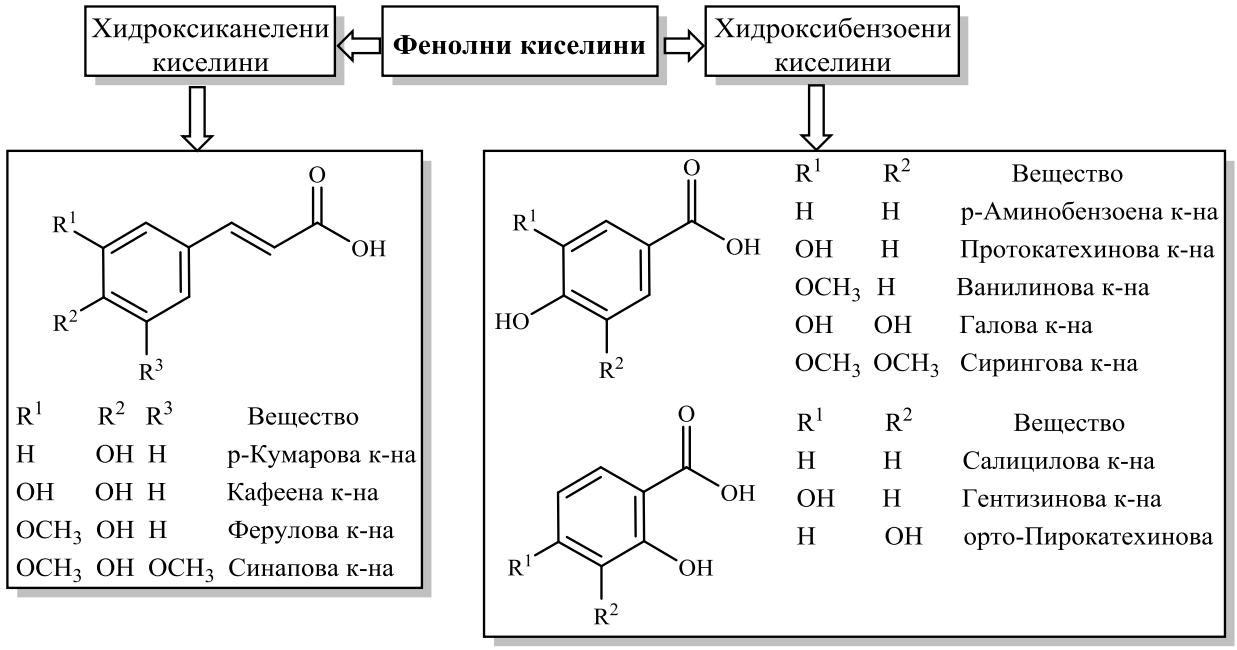
Лутеолина е естествено срещащ се флавоноид, който е показал благоприятни свойства в централната нервна система. Оценен е като потенциален агент за запазване на бариерната функция и инхибиране на възпалителните реакции при кръвно-мозъчната бариера. Следователно, по-доброто разбиране на процесите и механизмите, които водят до възпаление на кръвно-мозъчната бариера, може да доведе до откриване на нови терапевтични средства за борба с болестта на Алцхаймер [54]. Проведени изследвания показват, че лутеолинът може да служи като потенциален терапевтичен агент за профилактиката и/или лечението на болестта на Алцхаймер [54]. Луотеолинът проявява и противовъзпалителен ефект [55]. Той е основният флавоноид във вратига и инхибира клетъчната пролиферация, метастазите и ангиогенезата на множество видове рак, включително рак на гърдата [56].

Апигенин, лутеолин и други флавоноиди в имат хемопревантивни свойства срещу рак на гърдата. Затова тези съединения са полезни като потенциален превантивен или терапевтичен агент при лечението на рак на гърдата при хората [57]. Апигенинът и лутеолинът инхибират ксантиноксигеназата и по тази причина могат да се използват като средства срещу подагра и камъни (уратни) в бъбреците, а от друга страна двете съединения имат антимикробна активност [58]. Анализите на клетъчната жизнеспособност показват, че апигенинът проявява цитотоксичност спрямо двете множествени миеломни клетъчни линии и първични множествени клетки на миеломи, но не срещу нормални моноядрени клетки от периферна кръв [59].

2.2.5. Фенолни киселини

Фенолните киселини съдържат фенолен пръстен с една или няколко хидроксилни групи и могат да бъдат класифицирани в две основни групи: производни на хидроксибензоената киселина и производни на хидроксиканеленатата киселина [60] (Фиг. 8).

Фенолните киселини се разделят на производни на хидроксибензоената киселина (р-хидроксибензоена, протокатехинова, галова, ванилова, сирингова, салицилова и 3,4-дихидроксибензоена киселини) и хидрокси канеленатата киселини (розмаринова, кафеена, хлорогенова, пара-кумарова, синапена, ферулова и канелена киселини) [61, 62].



Фигура 8. Класификация и структура на фенолни киселини.

Хидроксиканелените киселини са най-големия клас фенолни съединения, описани при растенията [63, 64], като най-разпространения им представител в храните, консумирани от човека, е кафеената киселина, съдържаща се основно под формата на различни хлорогенни киселини. Други представители на хидроксиканелените киселини са р-кумаровата и феруловата киселини [65, 66]. Природните фенолни киселини, се срещат в свободна и в конюгирана форма, обикновено като естери или амиди. Фенолните киселини, и най-вече феруловата киселина, се срещат предимно в хранителните продукти като разтворими или неразтворими естери [39].

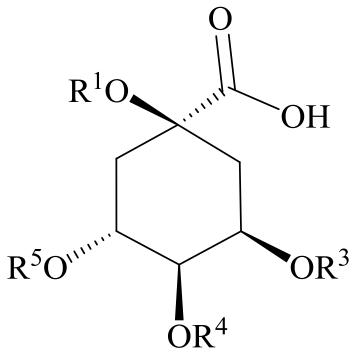
Галова, протокатехинова, ванилинова, хидроксибензоена, ферулова, кафеена и р-кумаровата киселини, се срещат в редица лечебни растения, подправки, плодове, зеленчуци и зърнени храни [67, 68, 69]. Съдържащите се в червените плодове (боровинка, къпина, малина, ягода, череша, вишна и касис) хидроксиканелени киселини (кафеена, ферулова, р-кумарова киселина) и р-хидроксибензоена определят тяхната антиоксидантна активност [47, 50, 70]. Двете фенолни хидроксилни групи, засилват редукционните свойства и спомагат за блокиране на реакции на липидна пероксидация [45]. Наличието на някои хидроксиканелените киселини (кафеена, ферулова, синапова и пара-кумарова) в свободна форма е било асоциирано с намален риск от развитието на сърдечносъдови заболявания, рак и други хронични заболявания [71]. Тези съединения имат способността да неутрализират свободни радикали и прооксидантни метали. При сравняването на редукционната им способност е установено, че кафеената киселина има най-силна антиоксидантна активност в сравнение с р-кумаровата и феруловата киселини, по отношение на инхибиране на окислението на LDL и неутрализиране на радикалите на синглетния кислород [72]. Доказателство, че хидроксианелените киселини могат да имат потенциален инхибиторен ефект върху раковата инвазия и метастази, се отчита все повече в научната литература. През последните години се полагат много усилия, за да се изяснят механизмите, с които хидроксиканелените киселини предотвратяват рака [73]. Доказано е, че хидроксиканелените киселини притежават потенциален инхибиторен ефект по отношение на раковата инвазия и метастазирането [73]. Много усилия са насочени към изясняването на механизмите, по които те възпрепятстват канцерогенезата. Инвазията и метастазирането са фундаментални свойства на злокачествените ракови клетки. Множество протеолитични ензими участват в тези процеси, които включват разграждането на извънклетъчния матрикс и на базалната мембрана. При CT26 клетки, третирани с фенилов естер на кафеената киселина (CAPE) се наблюдава не само инхибиране на клетъчната инвазия, но също така и намален синтез на матриксните металопротеинази-2/9 (MMP-2/9) и на растежния фактор на съдовия ендотел (VEGF) [73].

2.2.6. Хидроксицинамоилхинови киселини

Хидроксицинамоилхинови (хлорогенни) киселини са основен клас фенолни съединения, които се получават при естерификация на транс-каналените киселини

(например, кафеена, ферулова и р-кумарова) с (-)-хининова киселина. Те са подразделени според естеството и броя на каналените заместители и позицията на естерификация в циклохексановия пръстен на хиновата киселина [74]. Естерите се образуват предимно с хидроксилна група, разположен при петия въглероден атом, а също така с хидроксилни групи, разположени при въглеродните атоми на трета и четвърта позиция. По-рядко, естерите могат да се образуват с хидроксилната група разположена при първия въглероден атом [75, 76]. С кафеената киселина могат да образуват четири (1-, 3-, 4- и 5-) монокафеоилхинови киселини (CQA), шест (1,3-, 1,4-, 1,5-, 3,4-, 3,5- и 4,5) дикафеоилхинови киселини (DCQA) и четири (1,3,4-, 1,3-, 5-, 1,4,5- и 3,4,5-) трикафеилохинолови киселини [77] (Фиг. 9).

Съществуват проблеми с номенклатурата на изомерите, принадлежащи към семейството на хлорогенните киселини. Поради постепенните открития и изолиране на отделните изомери от множество източници, променящата се терминологична система, съществуват несъответствия в наименованията. Основното съединение на фамилията, 5-кафеоилхинова киселина (хлорогенова киселина), се е наричала 3-кафеоилхинова киселина преди 1976 г., когато се публикуват нови правила за номенклатурата. Много изследователи и доставчици на химикали обаче продължават да използват номенклатурата „преди IUPAC“ и неправилно наричат 3-кафеоилхинова киселина като хлорогенова киселина [78]. Кафеоилхиновите киселини спадат към групата фенолни съединения, които са вторични метаболити при растенията. При растенията тези съединения участват в защитните реакции спрямо ултравиолетовата радиация и различни патогени, както и за привличане на опрашители и на животни, разнасящи семената [60]. В природни продукти е открито съдържание на цис и транс изомери на 3-ацил, 4-ацил и 5-ацил р-кумароилхинови (pCoQA), кафеоилхинови (CQA) и феруоилхинови киселини (FQA), един изомер на 3,5-DCQA, 3-CQA-гликозид и два регионални изомера на (3 'и 4') гликозиди на 4-CQA [78].



R^1	R^3	R^4	R^5	Вещество
caffeoyl	H	H	H	1-CQA
H	caffeoyl	H	H	3-CQA
H	H	caffeoyl	H	4-CQA
H	H	H	caffeoyl	5-CQA
caffeoyl	caffeoyl	H	H	1,3-DCQA
caffeoyl	H	caffeoyl	H	1,4-DCQA
caffeoyl	H	H	caffeoyl	1,5-DCQA
H	caffeoyl	caffeoyl	H	3,4-DCQA
H	caffeoyl	H	caffeoyl	3,5-DCQA
H	H	caffeoyl	caffeoyl	4,5-DCQA

Фигура 9. Структура на кафеоилхинови и дикафеоилхинови киселини.

Кафеоилхиновите киселини са основни съставки в много билкови лекарства с различни биологични и фармакологични ефекти. Установено е, че при анализа на хлорогенните киселини и техните производни в растенията не може да се прилага екстракция при висока температура, тъй като причинява трансформация на кафеоилхиновите киселини, водеща до грешни количествени оценки на тези съединения. Те могат да се разграждат или изомеризират, не само от висока температура, но и от промяна на pH, светлината и някои разтворители. Изомеризацията, метилирането и хидролизата са трите основни пътища на разграждане на кафеоилхиновите киселини. Например, нагряването на 5-CQA в температурния диапазон от 100 - 200 C предизвика изомеризация и други трансформации. Междувременно 3-CQA и 3,5-дикафеоилхинови киселини (3,5-DCQA) са стабилни при киселинни условия, докато при неутрални и основни pH стойности, изомеризация на 3-CQA до 4-CQA / 5-CQA, както и изомеризацията на 3,5-DCQA до 3,4-DCQA и 4,5-DCQA настъпват бързо [79].

2.2.7. Биологична активност на кафеоилхиноновите киселини

Основният представител на тези съединения в природата, транс-5-О-кафеоилхинонова киселина, обикновено се използва като маркер за качество при контрола на различни фитохимични растения и лекарства. Предположението, че те могат да бъдат полезни в борбата със затлъстяването и да модулират глюкозо-6-фосфатазата, участващи в метаболизма на глюкозата, доведоха до съживяване на изследванията върху техните свойства [80, 81]. Хлорогеновата киселина е медицински важна съставка, намираща се в голям брой диетични и лечебни растения, притежаващо антиоксидантна активност, противовъзпалителни ефекти, антибактериални свойства, хипогликемичен и хиполипидемични действия, антитуморни и антихипертензивни ефекти [82]. Изследванията върху кафеоилхиновите киселини са фокусирани главно върху експерименти с 5CQA [83]. Тя е антиоксидант който предпазва от липидна пероксидация [84], проявява антиоксидантна активност за човешки липопротеин с ниска плътност [85], а също така подобрява на липидния метаболизъм [86]. Това съединение проявява антикарциногенни, антимутагенни и понижаващи глюкозата ефекти [87]. Логично е да се очаква, че другите два изомера, 3CQA и 4CQA, също ще проявяват различни биологични ефекти, включително антиоксидантна активност. Сравнително теоретично проучване показва, че кафеената и кафеоилхиновата киселина имат сходни антиоксидантни свойства [83]. Някои изомери на хлорогеновата киселина (3-, 4- и 5-CQA), показват антиоксидантна активност, изразяваща се в елиминиране на супероксидните радикали и инхибиторен ефект спрямо окислението на метиллинолеат [88]. Въпреки че механизмът, по който хидроксиканеленитe киселини потискат оксидантния стрес не е напълно изяснен, изглежда че той се опосредства от транслокацията на протеина Bad от цитозола в митохондриите, където той димеризира с Bcl-2 и Bcl-XL като по този начин неутрализира техния ефект по отношение стабилизиране на митохондриите [89]. Хлорогенните киселини могат да възпрепятстват индуцираното от оксидативния стрес чрез отваряне на

пори в митохондриалната мембрана като намаляват продукцията на протеините Bax и Bak и подпомагат повишаването на съотношенията Bcl2-BclXL/Bax-Bak [89]. Инхибирането на растежа и индуцирането на апоптоза от производни на кафеоилхинова киселина, като 5-О-кафеоилхинова киселина, са показани в няколко човешки ракови клетъчни линии [90].

Изследван е инхиращият потенциал на изолираните от бразилското лекарствено растение Hypericum brasiliense хлорогенова киселина, кафеена, канелена, p-метоксиканелена киселина и техни производни спрямо ензимите POP и DPP IV. Производните на тези киселини са получени, използвайки прости процедури на дериватизация и чрез реакции на свързване с аминокиселината пролин. Анализът е показал, че хлорогенните киселини и техните производи имат висока селективност и инхибиторна активност в много ниски концентрации за POP, докато за DPP IV тя е изразена при висока концентрация [91]. Било е установено, че дикафеоилхиновите фракции инхибират клетъчната пролиферацията на RKO и HT-29 човешки ракови клетки на дебелото черво чрез активиране на апоптоза посредством индукция на каспаза-8 и каспаза-3, а не спиране на клетъчния цикъл. Това предполага възможността DCQAs да се използват срещу рак на дебелото черво при хората [92, 93]. Наблюдавано е потискане на пролиферацията в човешка ракова клетка на дебелото черво (DLD-1) от дикафеоилхинови киселини показва, че DCQA понижава клетъчния растеж в зависимост от дозата [94]. Херпес симплекс вирусите (HSV-1 и HSV-2) са отговорни за дългосрочни латентни инфекции при хората. Липсата на ефективна ваксина и появата на резистентни вирусни щамове спрямо синтетични субстанции е причина за търсене на нови инхибитори. Установено е, че 3,5-DCQA, силно инхибира репликацията на HSV-1 и HSV-2 и е слабо цитотоксична [95]. Човешкият имунодефицитен вирус тип 1 (HIV-1) и други ретровируси изискват интегриране на двойно верижно ДНК копие на РНК генома в хромозомата на клетката гостоприемник за продуктивна инфекция. Вирусният ензим, интеграза, катализира интегрирането на ретровирусната ДНК и е цел за разработване на антиретровирусни агенти. Установено е, че някои дикафеоилхинови киселини (DCQAs), инхибират репликацията на HIV-1 в тъканната култура и каталитичната активност на HIV-1 интеграза in vitro. Инхибирането на ретровирусните интегрази е относително специфично и DCQAs няма ефект върху няколко други ДНК-модифициращи ензими и фосфорилтрансферази и типа на инхибиране на интеграза от DCQAs е необратим [96]. Изследваната in vivo антиоксидантна активност и възможният антидиабетен потенциал на 3,5-diCQA, изолирана от растителни източници показва хипогликемична активност и води до намаляване нивото на оксидативен стрес [97].

2.3. *Tanacetum vulgare* L.

Едно от лечебните растения, чийто потенциал от гледна точка на съвременната медицина и фармация не е разкрит достатъчно е *Tanacetum vulgare* L. (вратига). Причината за това е непълната информация относно химичния състав на

растението и решаването на проблема за стандартизацията на суровината от него. За обективна оценка относно лечебните свойства на вратигата липсва достатъчно информация. Във връзка с това е проучването на антитуморната активност на това растение от българската популация с широко приложение в народната медицина.
Родът Tanacetum е един от най-големите родове в семейство Asteraceae, състоящ се от 14 вида, разпространени в Европа. Химическият състав на видовете Tanacetum е обект на изследвания, тъй като се предполага, че терпеноидите, по-специално сескитерпеновите лактони, играят значителна роля в таксономията на растенията и притежават различни биологични активности [98].

2.3.1. Обща характеристика на *Tanacetum vulgare*



Фигура 10. *Tanacetum vulgare* L. (вратига).

Tanacetum vulgare L. (вратига) принадлежи на семейство Asteraceae) и е многогодишно, хладнолюбиво, тревисто растение широко разпространено в Европа, Азия и Северна Америка. Има многобройни изправени стъбла, високи 40-160 см, последователни пересто насечени листа и кръгли, плоски жълто-оранжеви сложни цветове с диаметър 5-8 мм, които се събират в краищата на стъблото и се разклоняват в гъсти съцветия [99]. Среща се близо до морското равнище до 1600 м надморска височина в гористи местности, ливади, пасища, прериите, планински степи, блата, торфища, градини, крайпътни напоителни канали, брегове на реки и езера. Приспособимо е към различни видове почви. Тя може да се открие в сухи, бедни на хранителни вещества, глинести и пясъчни почви, но процъфтява в богати на хранителни вещества, влажни и добре дренирани почви през лятото, а семената узряват през есента [100]. Младите ароматни листа са годни за консумация. Нарязани се използват в салати, пудинги, торти, бисквити, палачинки, рибни ястия. Натрошените листата от вратига са били използвани, за ароматизиране на уиски.

Вратига се използва като годно за консумация растение най-често от пивовари (вместо от хмел), сладкари и винопроизводители (като пикантно и ароматно растение) и като заместител на канелата и индийското орехче [100]. Изсушената билка има жълт цвят, характерна миризма и горчиво-сладък вкус поради което се използват в чайове и за гарниране, докато вследствие на ужасния аромат, получен от етеричните масла, растението традиционно се използва като репелент срещу мухи и други насекоми [100, 101]. През годините се появиха многобройни изследвания, свързани с полезните свойства на екстрактите от вратига и вторичните метаболити.

2.3.2. Химичен състав на вратига

Видовете *Tanacetum* съдържат главно сескитерпеноиди и полифенолни съединения са основните съставки на рода и са растителни биоактивни първоизточници [102]. Цветовете съдържат важни биолгично активни вещества като: жлъчни и други органични киселини, горчивото вещество тансетин, танин, смола, захари, микроелементи, смоли, мастни и етерични масла, екстракти за оцветяване, алкалоиди, фитоцианиди, минерали, витамин А, С, група В, каротеноиди (α каротин, ß-каротин и флавоксантин), кафеена, хинова, хлорогенна, галова и дикафеоилхинови киселини, значително количество флавоноиди, както и други полифенолни съединения.

Идентифицирани и изолирани са обикновени фитостероли (ситостерол, стигмастерол, кампестерол). В хидролизата от четири кисели пектинови полизахаридни фракции от цвета на вратига са изолирани като главни компоненти: галактуронова киселина, галактоза, арабиноза и рамноза, а също така и други монозахариди като глюкоза, ксилоза, и маноза. В проби от вратига са открити и някои антиоксиданти с ниско съдържание: метоксифенол; ацеталдехид; хидрохинон; 4-метилбензен; 4-терпиенол; 2-метил-4-пропенилфенол; бензоена киселина; 2-хидрокси-3-фенил-2-пропенова киселина; 2-метилбутенова киселина и др. Установено е и натрупване на някои микроелементи: манган, мед, никел, цинк, кобалт, кадмий, олово и кадмий. От цветове на вратига са изолирани кисели полизахаридни комплекси [103, 104].

Цветовете ѝ съдържат етерично масло, представляващо жълтеникава течност, с камфоро-подобна миризма, съставено от редица биологично активни съединения. Съставът на етеричното масло от вратига зависи от редица фактори, включващи частта на растението, онтогени (т.е., хемотип) на растението, сезонни промени, условия на околната среда и метод на екстракция. Етеричното масло съдържа над 100 летливи монотерпенови и сескитерпенови съединения [105]. В зависимост от това доминиращият компонент в него са бицикличните монотерпенови кетони: ß-туйон и α-туйон (до 47-70%). В значителни количества в маслото се съдържат: камфор, евкалиптол, алфа-пинен, мирцен, хризантенон (или хризантенил ацетат), р-цимол, борнеол, танацетин, камфен, лимонен, флаваноиди, хидроксикумарини, кверцетини, танинова киселина, смоли, стероли и др. [106, 107, 108]. В растенията

Tanacetum vulgare L., събрани от различни части на Румъния е определено значимо количество аскорбинова киселина, рибофлавин, пирокатехол [109].
Най-често представените данни в литературните източници са свързани с общо фенолно, флавоноидно, антоцианинно или каротеноидно съдържание на растителни екстракти [110]. Много по-малко са изследванията, свързани с определяне на индивидуалния състав на полифенолната фракция [61]. Такава е и ситуацията с определяне на нелетливите полифенолни вещества във вратигата.
Определени са общите полифеноли в растението, като основните компоненти са фенолни киселини, производни на кафеената киселина и флавоноиди и техни О-гликозиди. От фенолните киселини екстрактът от вратига е богат на ферулова, кафеена и розмаринова киселина. Доминиращото съединение е хлорогенова киселина, като други основни компоненти са изомери на дикафеоилхиновата киселина, а именно 3,5, 3,4, 1,5 и 4,5 дикафеоилхинови киселини [106, 108, 111].
Другата група полифеноли които са с високо съдържание в билката са флавоноиди и техни производни. Флавоноидите които са доказани в растението са лутеолин, апигенин, кверцитин, кемпферол, патулетин, кверцитрин, ериодиктиол, хрисоериол, 6-хидроксилутеолин, хиперозид, изокверцитрин, рутин, кверцетагетин 3,6-диметилетер (аксиларин) [106, 108, 111, 112].
Във вратигата флавоноидите преобладаващо са като О-гликозиди. Идентифицирани са лутеолин-7-О-глюкозид [106, 108, 113] , апигенин-7-О-глюкозид [107, 112], 7-О-глюкозиди на 6-хидроксилутеолин и скутеларин, [113], както и О-глюкозид на кверцитина [108, 113].
Като агликони влизащи в състава на 7-О-глюкуронидите са лутеолин [106, 108, 111], [113], апигенин [106, 113], както и хрисоериол и ериодиктиол.

2.3.3. Приложение в народната медицина

В народната медицина, стеблото, листата и цветовете се използват под формата на отвара или тинктура при чернодробни и бъбречни заболявания, като противовъзпалително, диуретично, антисептично, спазмолитично и противоглистно средство. Отварата от билки се използва за главоболие, диария, треска, анемия, гастрит, стомашна язва, хепатит, холецистит, ентероколит, епилепсия, истерия, астения, асцит, парализа, хемороиди, ревматизъм, артрит, цистит, нефрит, бронхиална астма, белодробна туберкулоза, остри респираторни инфекции. Прилага се външно под формата на гаргари, вани, компреси, лосиони като анестетик и средство за заздравяване на рани за рани, язви, гангрена, възпалено гърло, мазна себорея, сърбящ дерматит, крампи на краката, разстройства, артрит, ревматизъм, болка в ставите, дислокации, контузии. Описано е използването на отвара от цвета при рак на кожата.
Всички части на растението са отровни и употребата му може да предизвика конвулсии и дори смърт. Приемането на отвара от него трябва да става само по лекарско предписание и контрол. Противопоказно е използването от бременни жени (предизвика аборт) и малки деца, както и при възпаление на бъбреците и бъбречна недостатъчност [114]. Интересно е да се отбележи, че обикновената

вратига е включена в Германската хомеопатична фармакопея (GHP), която в момента е една от официалните хомеопатични фармакопеи в Европа.

2.3.4. Приложение в съвременната медицинска практика

Вратига и препаратите, базиращи се на нея, се използват в съвременната медицина. Цветовете имат холеретично действие, антиспазматични (намаляват честотата и амплитудата на махалото на контракциите на червата) противовъзпалителни свойства [115], показват антимикробна, антивирусна и антипротозойна активност. Съставките на цвета от вратига имат тонизиращ ефект върху холиновите и адренореактивните структури на организма.

Регионалната вариабилност на химичния състав на етерични масла *T. Vulgare L.* е от съществено значение и е добре известно че притежават интересни биологични свойства, както и противовъзпалителни, антиоксидантни, антибактериални и цитотоксични активности [116]. Доминиращото съединение в етеричните масла е транс-хризанфенилацетат, който притежава антиоксидантна антибактериална и активност [111]. Изследвания показват, че биологичната и антиоксидантаната активност на вратига зависи от хемотипа на туйона, един от основните компоненти на етеричното масло [106]. Екстрактите на вратига и нейното етерично масло с ниско съдържание на β-туйон могат да осигурят много обещаваща и ефективна алтернатива в областта на антимикробните приложения и опазването на храната, като антимикробната активност е по-висока спрямо Грам-положителните бактерии. Маслото притежава висок антиоксидантен потенциал, в който фенолните киселини са основен фактор и с доказана антипролиферативна активност към HeLa клетки и притежава силна активност срещу повечето изследвани гъбички, проявявайки фунгистатични и фунгицидни ефекти [108, 117, 118, 119].

Анализът на химическия състав на етерично масло *T. Vulgare L.* от северен Квебек, Канада, показал, че той се състои главно от монотерпена камфор, борнеол и 1,8-цинеол. Етеричното масло инхибира растежа на колоректалните ракови клетки Противовъзпалителния ефект на етеричното масло се дължи най-вероятно на α-хумулен, антиоксидантната активност на α-пинен, а антибиотичния на камфор [120]. Партенолидът, изолиран от въздушните части на *T. Vulgare L.*, защитава Vero клетките от инфекция с вируса на херпес симплекс (HSV-1) *in vitro* [117, 121]. Едно по-ранно фармакологично проучване е показало, че полизахаридният комплекс от цвета на вратига, съдържащ партенолид проявява противогъбично действие при плъхове с различни видове стомашни язви [103, 117].

Определен е полифенолния състав и антиоксидантната активност на вратига. Получените резултати показват, че *T. Vulgare L.* може да се счита за потенциален източник на полифеноли с антиоксидантни свойства на това лекарствено растение, за да се получат естествени фармацевтични продукти с терапевтична ефективност [112]. Основните причини за антиоксидантния капацитет на екстракти от цвят на вратига, освен монокафеоилхиновите киселини са и дикафеоилхиновите киселини [122]. Установената антиоксидантна активност на суровия екстракт и изолираните

активни съставки е в подкрепа на традиционните медицински употреби на растението [54], [123].

Някои видове от рода Tanacetum са известни от векове като важни лечебни растения и са включени в Европейската фармакопея като традиционно терапевтично лекарство за профилактика на мигрена [111]. Потенциалната му активност е потвърдена от няколко клинични изпитвания, които демонстрират понижаващия ефект върху интензивността и честотата на главоболие, зрителни нарушения, гадене и повръщане, предизвикани от мигрена [124].

От цветове на вратига са извлечени киселинни полизахариди, които могат да подобрят функцията на макрофагите и неутрофилите, което предполага, че тези свойства могат да допринесат за терапевтичната ефикасност на тези екстракти [104].

Противовъзпалителна активност проявяват основните флавонолови и флавонови метилови етери на растението инхибират главните пътища на метаболизма на арахидонатите в левкоцитите [100].

При изследване на флавоноидният състав на цветове от вратига в Самарската област (Русия) е установено, че тилианинът е доминиращ в тази суровина. Това представлява интерес от гледна точка на стандартизацията, като се има предвид фактът, че хепатозащитният и холегогичният препарат Танацехол, произведен в Русия от вратига се прилага при при заболявания на стомашно-чревния тракт и черния дроб [125].

В растенията *Tanacetum vulgare* L., събрани от различни части на Румъния са определени веществата във всички изследвани екстракти. Съдържанието на активните вещества в растението зависи от състава и качеството на почвата, както и от метеорологичните условия. Екстрактите, получени от цвета на вратига, показват по-високо съдържание на полифеноли в сравнение с тези, получени от листата. Екстрактите с ацетон и хлороформ, получени от цвета и листата на вратига, показват противовъзпалителна активност, водния диуретични свойства, а етаноловите екстракти имат антибактериални свойства [109].

Някои фармакопеи са описали употребата на вратига в лекарства за лечение на настинка и треска [107].

Фитохимичните изследвания позволиха идентифицирането на обикновени фитостероли и множество флавоноиди, като много от тези биологично активни съединения проявяват антимикробна активност срещу Грам-положителните бактерии и гъбични тестове и силна цитотоксична активност, както върху раковите клетки (HeLa), така и върху тези на нормалните (Vero) клетки [126].

Изследванията ца показали, че 3,5-DCQA, която е една от основните съставки в цветове на вратига, показва силно инхибиране на репликацията на HSV-1 (херпес симплекс вирус-1) и HSV-2 и е слабо цитотоксична [95].

T. vulgare L. е един от няколко вида *Asteraceae*, които проявяват антилевкемични свойства срещу J-45.01 човешка остра Т левкемична клетъчна линия и индуцират клетъчна смърт чрез апоптоза [117, 127].

Установена е селективна антитуморна активност на суров водно-етанолен екстракт от лечебното растение *Tanacetum vulgare* L. от българската популация срещу клетки

от туморната линия MCF-7 [128]. Хлороформната фракция на екстракта е показала по-силни антитуморни свойства върху клетките MCF-7 и изразено антитуморно действие спрямо раковите клетъчни линии HeLa и A2780. В клетките на рака на гърдата, хлороформната фракция нарушава клетъчния цикъл в S-фазата и предизвиква апоптоза in vitro [2].

Използването на растителни полифеноли и натурални биомолекули за синтез на наночастици може да се разглежда като на вариант за тяхното приложение в медицината. Изследвана е in vitro цитотоксичността на модифицирани от *T. Vulgare L.* сребърни наночастици, които са показали доза-зависима токсичност към клетъчни линии на рак на гърдата (MCF-7). Разработването на нови синтезирани сребърни наночастици с противоракови свойства за производството на нови лекарства, може да стане използвайки полифеноли от екстракт от вратига [129].

В България информацията за състава на полифенолни киселини и флавоноиди в ядливи и медицински растения е сравнително малка и ограничена. Разширяване обхвата на подобна информация би предоставило възможност за информиран избор на храна от страна на консуматора, както и употребата им във фармацията (фитотерапия, лечебна козметика), включване в лечебни хранителни режими – като хранителни добавки и компоненти на функционални храни и други [130, 131].

Химическият състав и цветовете на вратигата зависят от фактори като местообитание, климатични условия, сезонни изменения в условия на околната среда. За обективна оценка относно лечебните свойства на вратигата и нейното приложение е необходима по-детайлна информация за химичния състав на растението и решаването на проблема за стандартизацията на суровината от него.

3.ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

3.1 Цели

В настоящата научна разработка бяха поставени следните цели:

- Да се оцени in vitro антитуморният потенциал на екстрактите и фракциите от лечебното растение *Tanacetum vulgare L.* върху туморни човешки клетъчни линии и да се сравни с действието им върху контролна нетуморогенна клетъчна линия.
- Определяне на инхибиращия потенциал и селективност на тотални екстракти и фракции от вратига върху активността на постпролин-специфични протеази, свръхекспресията на които се наблюдава при различни злокачествени заболявания.

3.2 Задачи

За постигането на тези цели бе необходимо изпълнението на следните основни задачи:

- Да се установи химичният състав на използваните екстракти и фракции чрез мас-спектрометрия с висока разделителна способност, поради разликата в химичния и количествения състав на T. Vulgare L. в зависимост от годината на събиране на билката и метода на екстракция.
- Да се направи in vitro анализ на въздействието на екстракти и фракции от изследваното растение върху преживяемостта на туморни и трайни нормални човешки клетъчни линии с различен произход след третиране с различни концентрации от тези субстанции и определяне на IC_{50} стойностите.
- На базата на получените резултати относно цитотоксичните свойства на изследваните екстракти и фракции, да се подберат субстанциите, проявяващи най-силен in vitro антитуморен ефект и да се определи селективността по отношение на нетуморогенните клетки (индекс на селективност).
- Да се изследва инхибиторният ефект на суровия екстракт от вратига върху постпролин-специфичната ензимна активност в хомогенати от три човешки клетъчни линии от млечна жлеза (нормална и ракови).
- Да се изследва инхибиторният ефект на екстрактите и фракциите от вратига върху постпролин-специфичната ензимна активност в хомогенат от клетъчната линия MDA-MB-231 (високо инвазивен тройно негативен карцином на млечна жлеза). Да се определи типа на инхибиране и IC_{50} на най-активните фракции.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

4.1. Материали

4.1.1. Използвани химикали и реактиви

Ацетонитрил LC-MS grade Merck (Германия); етилацетат, диетилов етер, диизопропилов етер и хексан са от Fisher Chemical (UK); мравчена киселина, 98% е от Fluka (Германия). Водата с висока чистота се генерира като се използва Purelab UHQ II система от ELGA (Нидерландия). Z-Gly-Pro-AMC е от Bachem, Швейцария. Дициклохексиламин, диметилсулфоксид, Na_2SO_4, HCl, NaCl са от Sigma-Aldrich. EDTA е от AppliChem, а фосфатния буфер (NaH_2PO_4/ Na_2HPO_4) е от Merck (Германия) Всички реактиви са с най-висока налична чистота. DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) са от Sigma-Aldrich.

4.1.2. Използвани растителни материали

Цветовете и суровия екстракт на *T. vulgare* бяха любезно предоставени от фирма Вемо 99 ООД, София, България, (http://www.vemo-vsv.com/bg/produkti/). По данни на производителите, съдържанието на активни вещества на екстракта от от вратига включва: флавоноиди, изчислени като апигенин (от 18 до 22%); кумарини, изчислени като ескулин (7.5 до 9%); дъбилни вещества, изчислени като танини (от 7.5 до 9%).

4.1.3. Използвани клетъчни линии

В нашите *in vitro* експерименти използвахме няколко човешки туморни клетъчни линии като модели на разпространени онкологични заболявания, а като модел на нормална човешка тъкан използвахме нетуморогенна клетъчна линия от епител на млечна жлеза:

•**MCF10A (ATCC) –** спонтанно имортализирани клетки от епител на млечна жлеза

• **MCF7 (ATCC) –** инвазивен луминален аденокарцином на млечна жлеза тип А (ER+, PR+, HER2-)

• **MDA-MB-231 (ATCC) –** високо инвазивен тройно негативен карцином на млечна жлеза (ER-, PR-, HER2-)

• **H1299 (ATCC) –** дребноклетъчен карцином на бял дроб

• **A549 (ATCC) –** алвеоларен недребноклетъчен карцином на бял дроб

• **HeLa (ATCC) –** цервикален карцином

• **HepG2 (ATCC) –** хепатоцелуларен карцином

• **HT-29 (ATCC) –** карцином на дебело черво

• **PC3 (ATCC) –** аденокарцином на простата

4.2. Методи

4.2.1. Подготовка на растителни материали и екстракти

Процесите на фракциониране на цветовете и суровия екстракт на *T. Vulgare L.* беше осъществен в лаборатория по „Анализ и синтез на биоактивни вещества“ към катедрата по „Медицинска химия и биохимия“ на Медицински университет – София.

Приготвяне на етилацетатната фракция от суровия екстракт (EACE)

Към 5 g суров екстракт от вратига се прибавят 20 mL вода при разбъркване. След това на капки се прибавя 6N HCl до pH 3.0. Към водната фаза се прибавя 15 mL етилацетат при разбъркване. Органичната фаза се отделя и водната фаза се екстрахира с още 10 mL етилацетат. Събраните органични фази се филтруват, промиват се с наситен разтвор на NaCl и се сушат с Na_2SO_4. Етилацетатът се отстранява под вакуум и се прибавя малък обем диизопропилов етер. Полученото тъмно жълто твърдо вещество се филтрува и се суши под вакуум в ексикатор. Получения добив е 260 mg.

Приготвяне на фракция от дициклохексиламониеви соли (DCHAS)

Фракцията от дициклохексиламониевите соли се получават от етилацетатния екстракт, както следва: Обемът на етилацетатния екстракт се намалява до 1/4 и на капки се добавя дициклохексиламин. Получената утайка се филтрува, промива се с диизопропилов етер и се суши под вакуум в ексикатор. Получения добив е 125 mg.

Изолиране на твърдо вещество от диетилов етер/хексан (DEHS)

Филтратът, получен след отстраняване на дициклохексиламониевите соли, се концентрира под вакуум, до получаване на гъст маслен остатък. Към остатъка се прибавя диетилов етер, последван от хексан, при което се получава тъмножълта утайка. Получения добив е 74 mg.

Приготвяне на етилацетатен екстракт от цветове на вратига (EAFT)

Към 4 g цветове от вратига бяха добавени 16 mL вода и 48 mL етилацетат при разбъркване. След това 6N HCl се добавя на капки до pH 3.0 на водната фаза и сместа се разбърква за още един час. След филтруване органичната фаза, тя се промива с наситен разтвор на NaCl и се суши с Na_2SO_4. Етилацетатът се отстранява под вакуум и се прибавя малък обем диизопропилов етер. Получената жълта утайка се филтрува и се суши под вакуум в ексикатор. Получения добив е 218 mg.

Фракциониране на суровия екстракт чрез колонна хроматография

Суровия екстракт на *T. Vulgare L.* предоставен от фирма Вемо 99 ООД (500 mg) се разтваря в 10 mL 0.1% буфер на мравчена киселина чрез ултразвукова асистирана екстракция в продължение на 20 минути. След това се фракционира посредством хроматографска система Grace Davison Purification(USA) Reveleris® Flash System. Хроматографското разделяне на пробите се извършва чрез носител на модифициран силикагел: колона Claricep C_{18} (Bonna-Angela), 80 g, с размер на частиците 20-45 μm и размер на порите 100Å, носител на ELSD детектор: изопропанол, облъчване на две UV дължини на вълната (UV1: 254 nm и UV2: 325 nm), като се използват следните подвижни фази: А: вода и Б: ацетонитрил при скорост на потока от 40 mL/min и градиент (62 min): 0% B за 2 min, 23% B за 50 min, 90% B за 3 min, задържаме 90% B за 4 min и 0% B за 3 min. Обемът на инжектиране на пробата е 10 mL.

4.2.2. Клетъчно култивиране

Туморните клетки бяха култивирани рутинно като монослоеве в 75 cm^2 матраци в хранителна среда DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) с високо съдържание на глюкоза (4.5 ‰) с добавка на 10% фетален телешки серум и антибиотици в стандартни концентрации (100 U/mL пеницилин, 0.1 mg/mL стрептомицин и 0.25 mg/mL амфотерицин B) на 37ºC при 5% CO_2 и 95-96 % влажност. Нетуморогенните клетки от линията MCF-10A бяха култивирани при същите условия, но в присъствие на фактори, стимулиращи клетъчния растеж: 20 mg/L човешки епидермален растежен фактор (EGF), 0,5 mg/L хидрокортизон, 0,1 mg/L холерен токсин и 10 mg/L инсулин.

Клетките бяха посявани при плътност от 1 x 10^3 в 100 μL в 96-ямкови плоскодънни плаки за клетъчно култивиране и оставени да адхезират за 24 часа. Преди третиране, културалната среда се отлива и се прибавя нова, съдържаща тестовите съединения, разтворени в етанол, в такива количества, че да се достигнат желаните изпитвани концентрации (концентрационен интервал от 10 до 500 μg/mL). Инкубацията в присъствие на тестираните съединения продължава 72 часа. Всички експерименти се извършват трикратно.

Клетките бяха събирани с помощта на гумен скрейпър и хомогенизирани при използване на хомогенизатор MSE (England) в 5 mL 0.1 M фосфатен буфер (pH 7.4) с 0.1 M NaCl и 1 mM EDTA.

4.2.3. In vitro антитуморна активност чрез MTT-анализ

Изследването на антитуморната активност беше извършено върху клетъчни култури от няколко човешки туморни клетъчни линии с помощта на стандартен MTT-тест [131].

MTT анализът на клетъчната преживяемост и пролиферация беше проведен в широк диапазон от концентрации на изследваните екстракти/фракции. Границите, в които варираха приложените концентрации, бяха специфични за различните субстанции и бяха подбрани въз основа на предварителни експерименти, включващи по-големи концентрационни интервали, с цел точно установяване стойностите на IC_{50}.

Количеството на отделения формазан беше определяно посредством измерване на абсорбцията при 580 nm с помощта на четящо устройство за микроплаки (TECAN, Sunrise TM, Groedig / Salzburg, Австрия). Антипролиферативната активност беше изразена чрез IC_{50} - концентрацията, необходима за 50% потискане на клетъчния растеж спрямо нетретираната контрола. За изчисляването на IC_{50} беше прилаган нелинеен регресионен анализ (GraphPad Prizm4 Software). Беше установена добра възпроизводимост на резултатите (SD < ± 10%). Статистически значимите разлики в преживяемостта/пролиферацията между нетретираните контроли и третираните с различни концентрации проби бяха определяни посредством еднофакторен дисперсионен анализ ANOVA, последван от теста на Bonferroni. За статистически значими бяха приемани резултатите при стойност на $p<0.05$.

4.2.4. Измерване на ензимната активност

Ензимната активност в клетъчни хомогенати в присъствие на екстракти и фракции от вратига

Пост-пролин ензимната активност в клетъчните хомогенати беше измервана в присъствието на 0,1 или 0,2 mg/ml екстракти и фракции от вратига в 0.1 M фосфатен буфер (pH 7.4), съдържащ 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA и 80 μM флуорогенен субстрат Z-Gly-Pro-AMC при 37 °C. Ензимните реакции бяха проведени в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscan Fluorescence при 360 nm възбуждане и 460 nm емисия и отчитане на всеки 3 минути. Ензимната активност беше определена от началните скорости на реакциите. За обработка на данни беше използвана софтуерната програма EnzFitter V2.

Определяне на IC_{50}

Инхибиращият потенциал на фракцията 34-44 спрямо ензимната активност в хомогенат от клетки на MDA-MB-231 беше измерен в 0.1 M фосфатен буфер (pH 7.4), съдържащ 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA и 80 μM флуорогенен субстрат Z-Gly-Pro-AMC при 37 °C в присъствие на различни концентрации (5, 10, 15, 20, 25, 37.5 и 50 μg/mL) от фракция 34-44. Реакциите бяха проведени в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscan Fluorescence при 360 nm възбуждане и 460 nm емисия и отчитане на всеки 3 минути. Ензимната активност беше определена от началните скорости на реакциите. За обработка на данни беше използвана софтуерната програма EnzFitter V2.

Определяне на типа на инхибиране

Ензимната активност в клетъчните хомогенати беше измервана в 0.1 M фосфатен буфер (pH 7.4), съдържащ 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA и при 37 °C. Бяха използвани различни концентрации от флуорогенния субстрат Z-Gly-Pro-AMC (20, 30, 40 и 50 μM) в отсъствие и присъствие на различни концентрации (50 и 75 μg/mL) от фракция 34-44. Реакциите бяха проведени в 96-ямкови плаки, в мултифункционален спектрофлуориметър Varioscan Fluorescence при 360 nm възбуждане и 460 nm емисия и отчитане на всеки 3 минути. Ензимната активност беше определена от началните скорости на реакциите. За обработка на данни беше използвана софтуерната програма EnzFitter V2.

4.2.5. Подготовка на проби за LC-HRMS анализи

Екстрактите от вратига (3 mg) се разтварят в 1 mL 0.1% буфер на мравчена киселина чрез ултразвукова асистирана екстракция в продължение на 15 минути и бяха подложени на LC-HRMS анализи.

4.2.6. LC-HRMS анализи

Анализите се извършват с използване на Q Exactive хибриден квадруполен масспектрометричен детектор с висока разделителна способност (ThermoScientific Co, USA), оборудван с TurboFlow® течна хроматографска система, нагрят електроспрей модел HESI II на IonMax® (ThermoScientific Co, USA).
Хроматографското разделяне на пробите се извършва чрез колона Hypersil Gold (100 mm×2,1 mm id, 1,9 μm), като се използват следните подвижни фази: А: 0,1% мравчена киселина във вода и Б: 0,1% мравчена киселина в ацетонитрил при скорост на потока от 300 μL/min и градиент: 0% B за 1 min, 30-90% B за 30 min, 90% B за 5 min, 90 - 0% B за 2 min и 0% B за 2 min. Обемът на инжектиране на пробата е 10,0 μL.
Бяха получени спектри на пълно сканиране в обхвата 80-1200 m/z (съотношение маса/заряд) в режим на отрицателен йон при разделителната способност 70 000. Всички параметри на мас-спектрометъра бяха оптимизирани за чувствителност към целевите анализи, използвайки софтуерната програма за контрол. Параметрите на масспектрометричния детектор са: напрежение на разпръскване 4.0 kV, дебит на газа за вертешно разпръскване 32 относителни единици (OE), дебит на допълнителния газ 10 OE, дебит на резервния газ 3 OE, температура на капиляра 320 °C, температура на нагреваемия източник на електроспрея 300 °C и напрежение на S-лещата 50 V. За количествено определяне кафеоилхинови киселини беше използван режим на фрагментиране на всички йони. Нормализираната колизионна енергия, която е прилагана в клетката за разбиване на йоните е 25%. Събирането и обработката на данните бяха извършени със софтуерен пакет Xcalibur 2.4® (ThermoScientific Co, USA). Изчисленията за теоретични стойности в съотношение маса/заряд са направени от софтуерната програма Mass Frontier 5.1 (ThermoScientific Co, USA).

5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

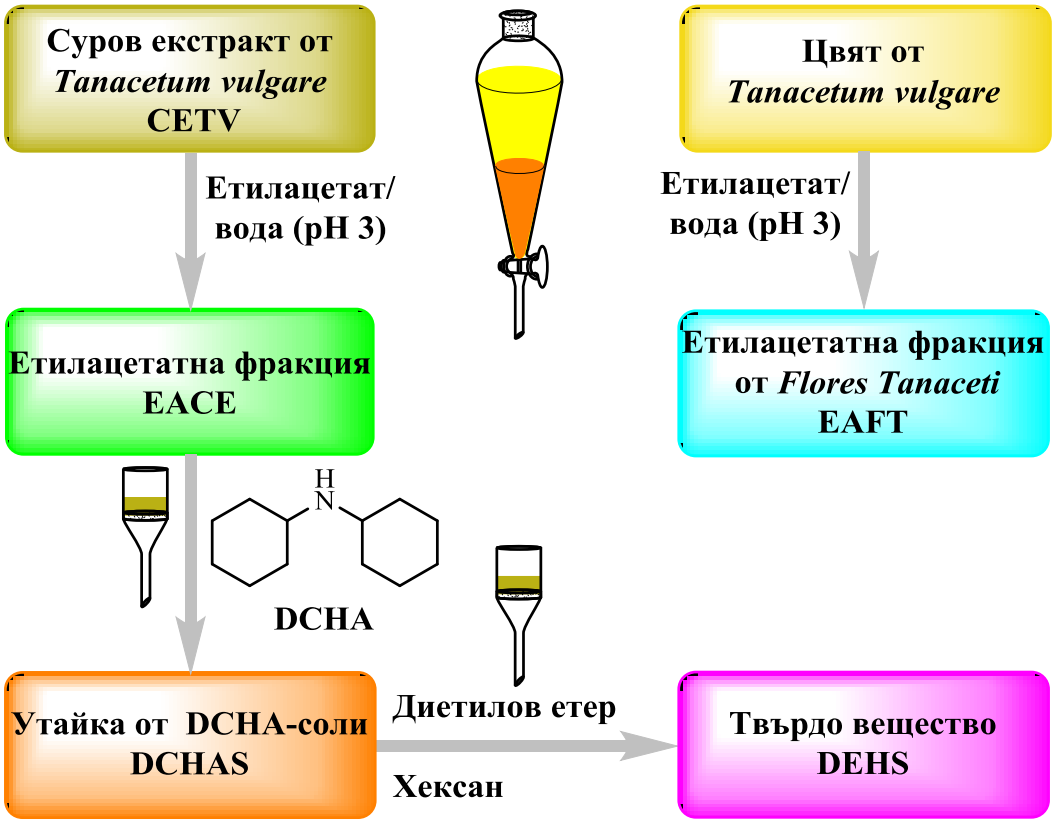
5.1. Екстракти и фракции от вратига

Екстракцията е най-важната първа стъпка в анализа на лечебните растения, тъй като е необходимо да се извлекат желаните химични компоненти от растителните материали за по-нататъшно разделяне и охарактеризиране. Трябва да се предприемат подходящи действия, за да се гарантира, че потенциалните активни съставки няма да се загубят или унищожават по време на приготвянето на екстракта от растителните проби. Един от ключовите фактори е избор на система от разтворители което до голяма степен зависи от специфичната природа на биоактивните съединения. За екстракцията на полярни и/или хидрофилни съединения се използват полярни разтворители като метанол, етанол и техни смеси с вода. Сместа етанол-вода предизвиква подуване на растителните частици и увеличава порьозността на клетъчните стени и по този начин улеснява дифузията на екстрахираните вещества. За екстракция на повечето липофилни съединения се използват хлороформ, дихлорометан или техни смеси с метанол. Една ефикасна система за екстрахиране е системата течност – течност (двуфазни системи) с използване на органични разтворители и вода. Тези класически системи имат специфични характеристики, които ги правят ефективни по отношение на екстракцията и фракционирането на биоактивните компоненти, но те не намират достатъчно широка употреба. Един от критериите за подбор на разтворител е и коефициента на разпределение. За съединения които участват в протолитични реакции, от съществено значение за коефициента на разпределение е pH на средата. Този фактор обаче, не винаги се отчита. Ефективността на извличане на фенолните съединения зависи от полярността на използвания разтворител. Като органични разтворители за извличане на тези вещества са тествани гореща вода, метанол, етанол, ацетон, етилацетат, диетилов етер, петролев етер и n-хексан [140]. Етилацетаът е бил предложен от като органичен разтворител подходящ за извличане на полифеноли.

Съгласно казаното по-горе, ние предложихме стратегия за получаване на екстракти и фракции от *T. Vulgare L.* На фигура 11 сме представили схематично протокола за получаване на различните екстракти и фракции от растението, които са използвани за анализиране на основните компоненти в тях и са тествани за биологична активност. Прахообразният суров екстракт (предоставен от фирма Вемо 99 ООД) от вратига се разтваря във вода и pH на водната фаза се довежда до 3, след което се добавя етилацетат. При това pH, веществата с киселинен характер преминават в неутрално състояние, което води до увеличаване на коефициентите им на разпределение и се осъществява по-ефективна екстракция в органичната фаза. Известно е, че в апротни разтворители, дициклохексиламина дава малко разтворими и добре кристализиращи соли с карбоксилни киселини съдържащи различни функционални групи. Това ни даде основание да се опитаме да отделим съединенията с киселинен характер от другите вещества, превръщайки ги в

дициклохексиламониеви соли. При добавяне на дициклохексиламин към органичната фаза се беше наблюдавано отделяне на значително количество утайка, която бе анализирана чрез LC-HRMS. От филтрата, след концентриране и третиране с диетилов етер и хексан, бе получена твърда субстанция, която също бе анализирана чрез LC-HRMS.

Традиционно фракционирането на биоактивните компоненти от билки се извършва на два етапа. Първо се прави суров екстракт, най-често при използване на водно-алкохолни смеси и после фракционирането се провежда чрез използване на двуфазна система - органичен разтворител и вода. Фракционирането може да се направи и в един етап, като екстракцията на билката се извърши в двуфазна система. Ние направихме екстракция на цветове от вратига при използване на система етилацетат и вода, като pH на водната фаза бе доведено до 3. Водата предизвиква подуване на растителните частици и увеличава порьозността на клетъчните стени и по този начин улеснява дифузията на екстрахираните вещества в органичния разтворител. Използването на сух етилацетат води до значително намаляване на количеството на получения екстракт. Съдържанието на органичната фаза бе анализирано чрез LC-HRMS.



Фиг. 11 Схема на получаване на екстракти и фракции от *T. Vulgare L.*

5.2. Определяне на химичния състав на екстрактите и фракциите от вратига

5.2.1 Характеризиране на съединенията в суровия екстракт

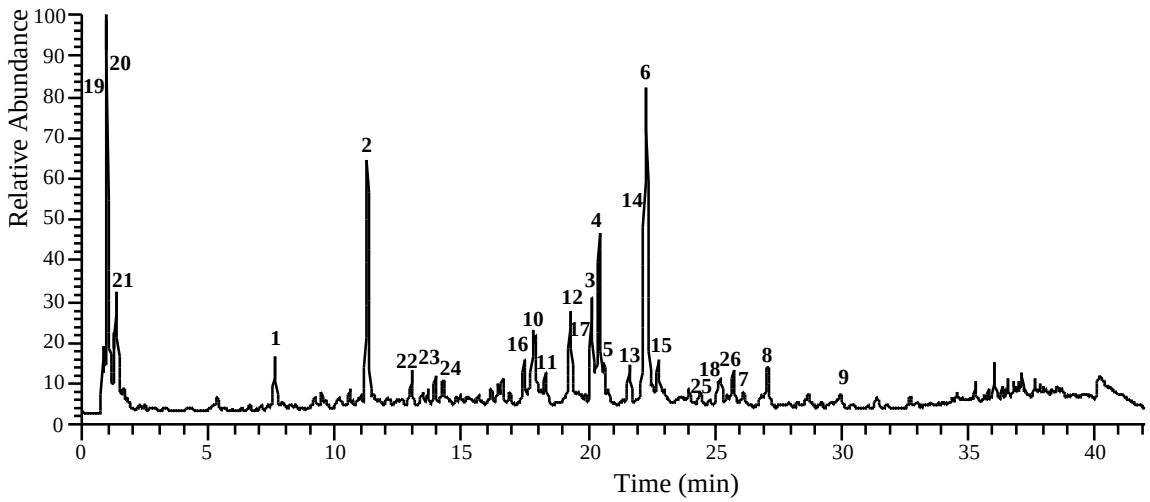
За определяне на основните нелетливи съединения в екстракта на *T. Vulgare L.*, предоставен от фирма Вемо 99 ООД, използвахме течна хроматография съчетана с мас-спектрометрия с висока разделителна способност (LC-HRMS), в режим на отрицателна йонизация. Идентифицирането на съединенията е извършено чрез MS^2 анализи, които са сравнени с литературни данни. Получените от нас резултати са обобщени в таблица 1. Общата йонна хроматограма (TIC) на суровия екстракт е представена на фигура 12.

Таблица 1. Идентифициране на фитохимичните съединения в суровия екстракт от *T. Vulgare L.* чрез LC-HRMS в отрицателен режим.

Пик №	$[M-H]^-$ m/z δ (ppm)	Молекулна формула	MS^2 данни m/z, (R.I., %)	Идентифцирано вещество[a]
	Кафеоилхинови киселини			
1	353.0873 (0.79)	$C_{16}H_{18}O_9$	191.0548 (73), 179.0336 (18), 135.0435 (100), 85.0277 (12)	3-кафеоилхинова киселина [106, 108]
2	353.0871 (1.01)	$C_{16}H_{18}O_9$	191.0548 (100), 173.0441 (8)	5-кафеоилхинова киселина [106, 108]
3	515.1185 (0.25)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.0873 (9), 335.0770 (7), 191.0548 (50), 179.0336 (91), 173.0442 (100), 161.0229 (27), 155.0334 (11), 135.0435 (34)	3,4-дикафеоилхинова киселина [106, 108]
4	515.1186 (0.36)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.0872 (33), 191.0548 (100), 179.0336 (66), 173.0442 (4), 161.0229 (5), 135.0435 (23)	3,5-дикафеоилхинова киселина [106, 108]
5	515.1186 (0.48)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	191.0548 (100), 179.0336 (12), 161.0229 (8), 135.0435 (6)	1,5-дикафеоилхинова киселина [133, 134]
6	515.1186 (0.36)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	353.0874 (46), 191.0549 (34), 179.0337 (73), 173.0442 (100), 161.0230 (5), 135.0436 (22)	4,5-дикафеоилхинова киселина [106, 108]
	Флавоноиди			
7	285.0402 (0.89)	$C_{15}H_{10}O_6$	151.0021 (10), 133.0279 (100), 107.0122 (11)	Лутеолин [106,108,113]
8	345.0613 (2.27)	$C_{17}H_{14}O_8$	330.0379 (22), 315.0144 (72), 287.0194 (100), 149.0229 (50)	Кверцетагетин диметил етер [106, 108]
9	329.0663 (0.76)	$C_{17}H_{14}O_7$	299.0189 (22), 271.0244 (100), 243.0289 (7), 227.0340 (6), 199.0389 (10)	Еупалитин [108, 113]

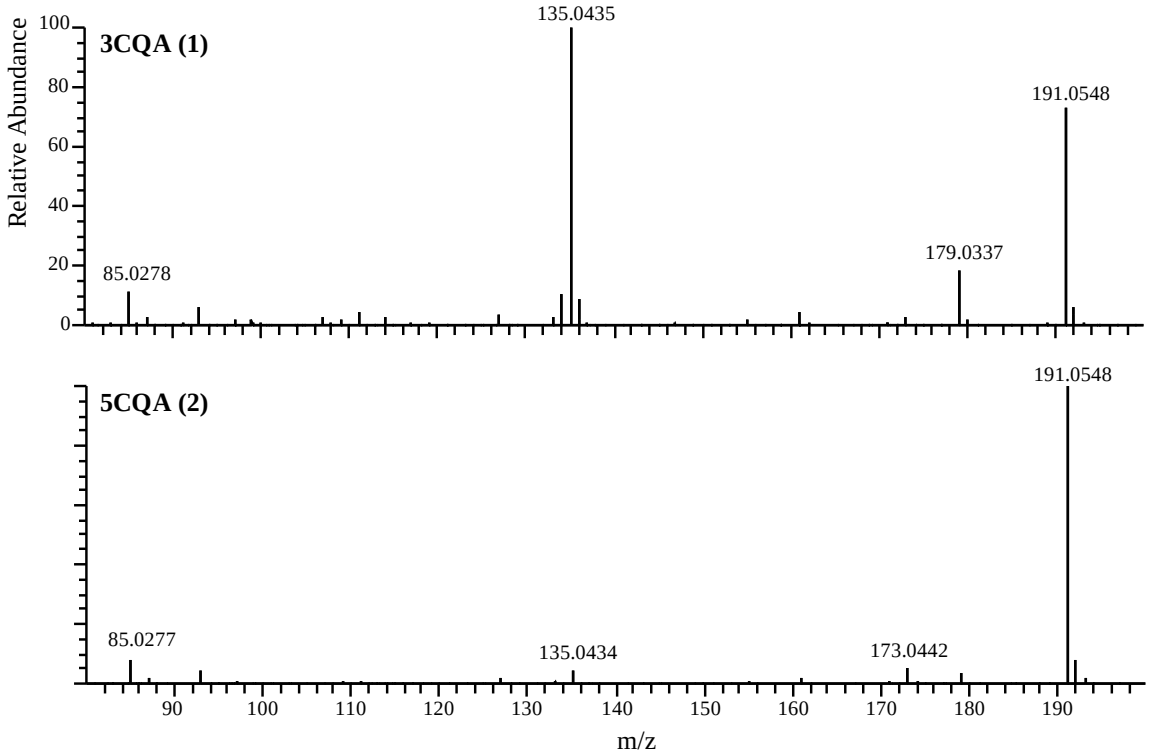
	Флавоноиди О-глюкурониди			
10	463.0877 (0.60)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	287.0556 (13), 151.0021 (100), 135.0435 (40), 113.0228 (9)	Ериодиктиол-О-глюкуронид [113]
11	477.0662 (0.25)	$C_{21}H_{18}O_{13}$	301.0347 (100), 178.9973 (5), 151.0021 (15)	Кверцетин-3-О-глюкуронид [135]
12	461.0720 (0.21)	$C_{21}H_{18}O_{12}$	285.0399 (100)	Лутеолин-7-О-глюкуронид [106, 108, 113]
13	445.0772 (1.51)	$C_{21}H_{18}O_{11}$	269.0452 (100), 113.0227 (12)	Апигенин-7-О-глюкуронид [106,113]
14	477.1028 (0.06)	$C_{22}H_{22}O_{12}$	301.0710 (100), 286.0477 (25), 242.0575 (15), 199.0547 (10), 151.0020 (22)	Хомоериодиктиол-О-глюкуронид [136]
15	475.0876 (1.08)	$C_{22}H_{20}O_{12}$	300.0588 (12), 299.0556 (68), 284.0322 (100), 175.0235 (17), 113.0227 (45)	Крисоериол-7-О-глюкуронид [113]
	Флавоноиди О-глюкозиди			
16	463.0877 (1.31)	$C_{21}H_{20}O_{12}$	301.0343 (100), 300.0271 (78)	Кверцетин-3-О-глюкозид [108]
17	447.0928 (0.43)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	285.0399 (100), 284.0321(12)	Лутеолин-7-О-глюкозид [106,108,113]
18	609.1247 (0.87)	$C_{30}H_{26}O_{14}$	447.0928 (3), 323.0766 (5), 286.0432 (16), 285.0401 (100), 179.0336 (8), 161.0229 (15)	Кемпферол-О-(кафеоил)глюкозид [137]
	Органични киселини			
19	195.0495 (-0.11)	$C_6H_{12}O_7$	129.0178 (100)	Глюконова киселина [138]
20	191.0549 (-0.20)	$C_7H_{12}O_6$		Хинова киселина [106]
21	191.0186 (-0.03)	$C_6H_8O_7$	173.0443 (11), 111.0072 (100), 87.0011 (60)	Лимонена киселина [139]
	Неизвестни съединения			
22	387.1647 (-0.22)	$C_{18}H_{28}O_9$	305.0704 (35), 263.0597 (15)	
23	281.1390 (0.63)	$C_{15}H_{22}O_5$		
24	281.1391 (0.66)	$C_{15}H_{22}O_5$	185.0959 (100)	
25	419.0975 (0.62)	$C_{20}H_{20}O_{10}$	161.0230 (14), 152.0098 (62), 109.0278 (21), 108.0199 (100)	Производно на дихидроксибензоена киселина
26	461.2389 (0.83)	$C_{22}H_{38}O_{10}$	301.0347 (18), 287.0555 (12), 151.0022 (100), 121.0277 (22), 107.0121 (29)	

[a] Съгласно литературни източници за наличието на тези съединения във вратига или въз основа на сравнението на m/z стойностите от MS^2 спектрите с литературните данни.



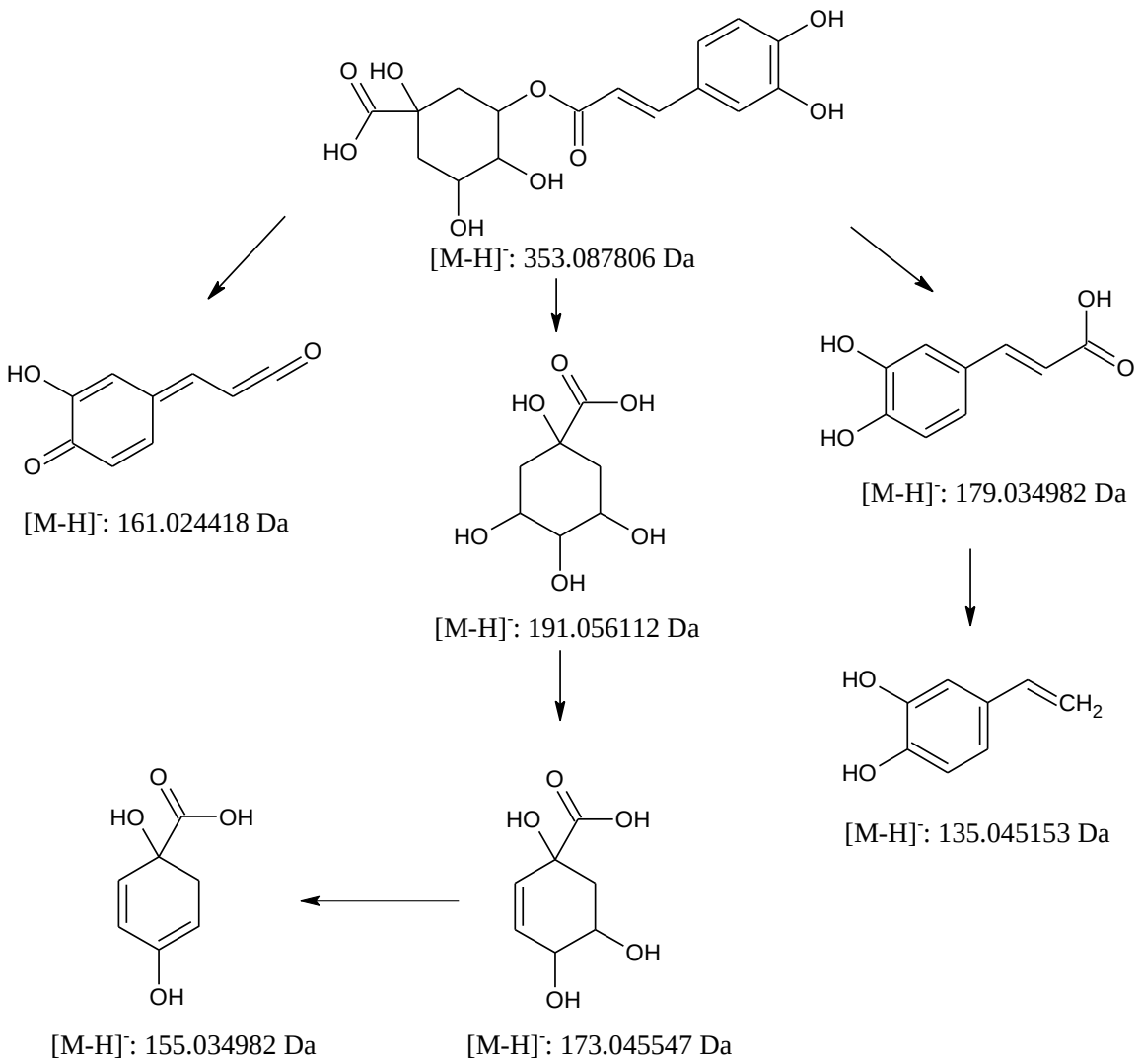
Фиг. 12. Обща йонна хроматограма (TIC) на суров екстракт от *T. Vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация. Номерирането на съединенията съответства на таблица 1.

Съединенията **1** и **2** показват $[M-H]^-$ йон с m/z 353.08 в отрицателен режим, който съответства на два изомера на кафеоилхиновата киселина (CQA). MS^2 спектрите на тези вещества са представени на фигура 13.

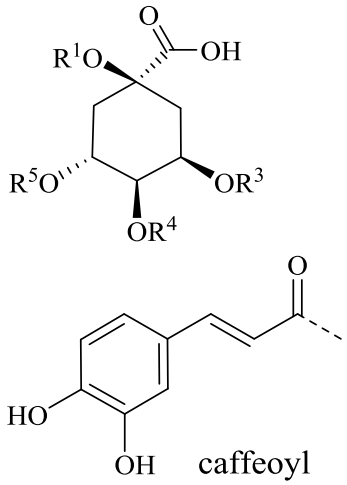


Фигура 13. MS^2 спектрите на съединения **1** и **2**.

Първичните пътища на разграждане на изомерните CQAs генерират фрагментни йони (Фиг. 14), такива като m/z 191, съответстващ на [хинова киселина-H]$^-$, m/z 179, съответстващ на [кафеена киселина-H]$^-$, m/z 173, съответстващ на [хинова киселина-H-H_2O]$^-$ и m/z 135, съответстващ на [кафеената киселина-CO_2]$^-$. Структурите на фрагментните йони, генерирани от CQAs са данени на фигура 14. Те са диагностични йони и разликите в тяхната интензивност могат да се използват за идентифициране на точните структури на CQAs [133, 134]. В спектъра на съединение **1** с най-висока относителна интензивност е йона с m/z 135, следван от йоните с m/z 191 и m/z 179. От своя страна, в спектъра на изомерната CQA (съединение **2**) се наблюдава практически само един йон с m/z 191. Така, съпоставяйки MS^2 спектрите получени от нас и тези от литературни данни [133, 134], съединенията **1** и **2** могат да бъдат идентифицирани съответно като 3-CQA и 5-CQA. Структурата на монокафеоилхиновите киселини са представени на фигура 15.



Фигура 14. Пътища на фрагментиране на CQAs и структура на получените йони.



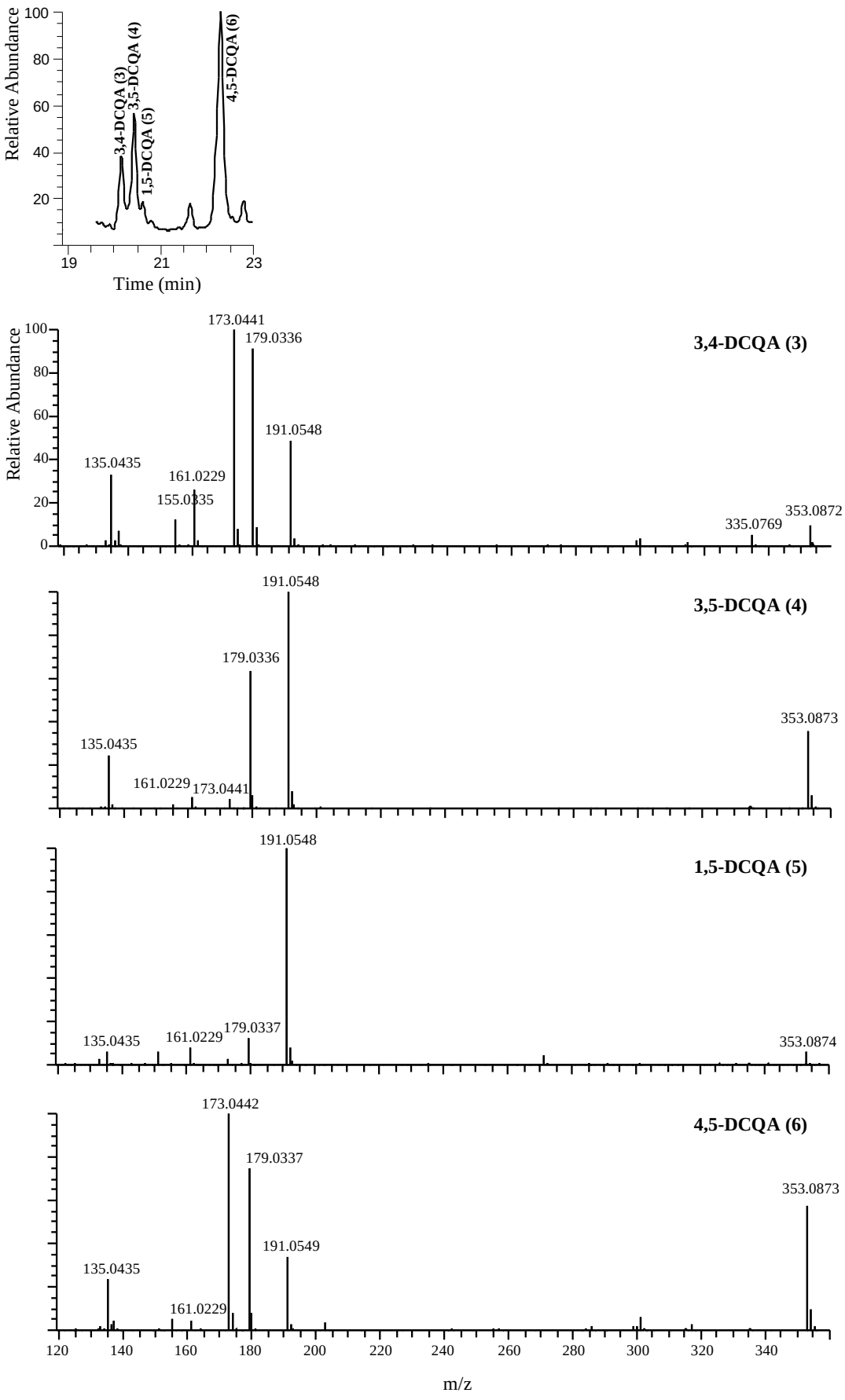
R^1	R^3	R^4	R^5	Вещество	
H	caffeoyl	H	H	3-CQA	(**1**)
H	H	H	caffeoyl	5-CQA	(**2**)
caffeoyl	H	H	caffeoyl	1,5-DCQA	(**5**)
H	caffeoyl	caffeoyl	H	3,4-DCQA	(**3**)
H	caffeoyl	H	caffeoyl	3,5-DCQA	(**4**)
H	H	caffeoyl	caffeoyl	4,5-DCQA	(**6**)

Фигура 15. Структура на откритите в суровия екстракт хлорогенни киселини.

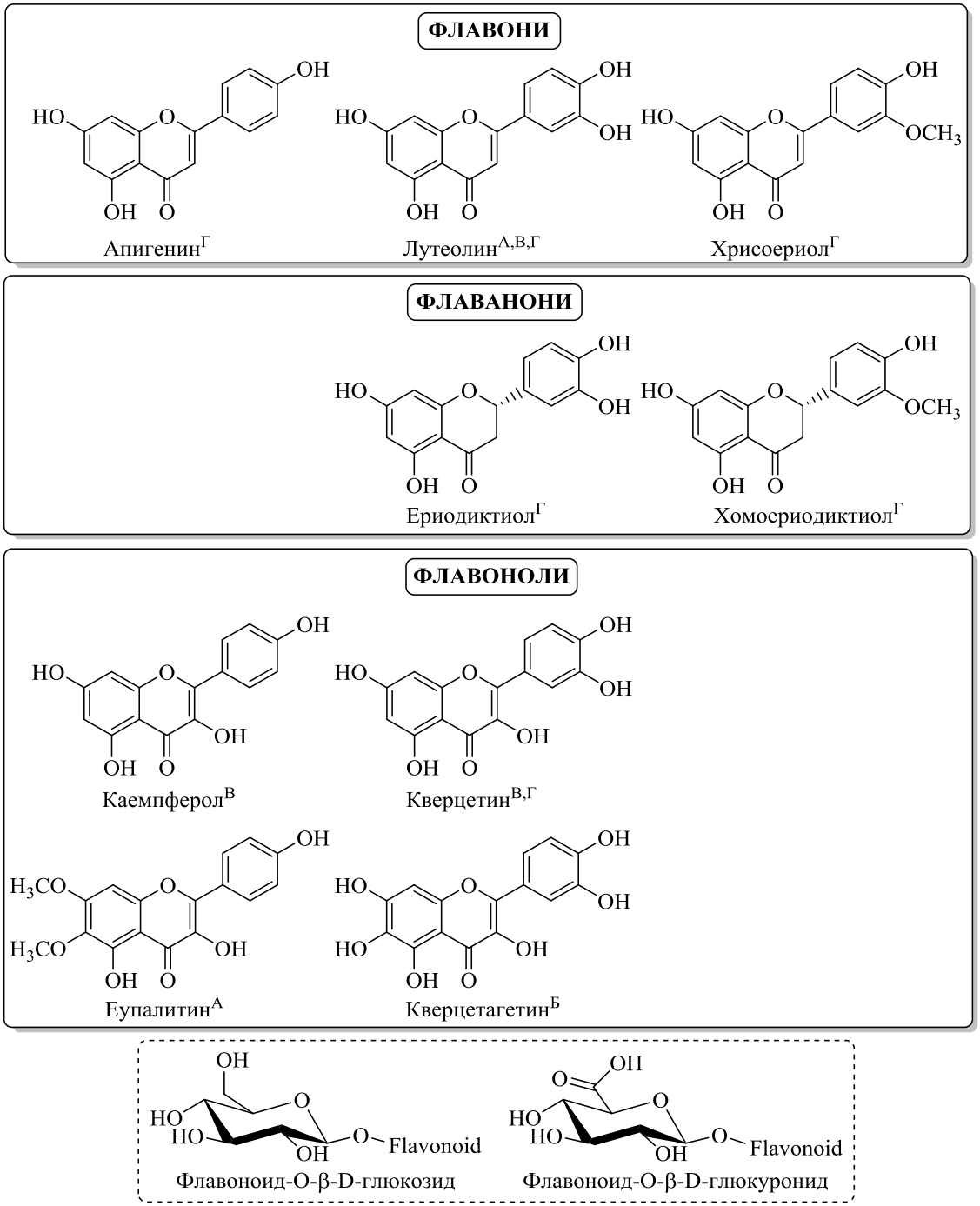
Съединенията **3**-**6** дават $[M-H]^-$ йони с m/z 515.12 което показва, че те са изомери на дикафеоилхиновата киселина (DCQA). Техните диагностични йони са същите като на CQA, но в техните MS^2 спектри има и характерен йон с m/z 353.08, съответстващ на $[CQA-H]^-$. Структурата на дикафеоилхиновите киселини са представени на фигура 15, а техните MS^2 спектри са показани на фигура 16.

В MS^2 спектъра на съединение **3** най-интензивния йон е с m/z 173, следван от m/z 179 (91%) и m/z 191 (50%). В спектъра му има и ниско интензивен йон с m/z 335 (7%), който е специфичен и се наблюдава в спектъра само на 3,4-DCQA [132, 133]. В MS^2 спектъра на съединение **4** най-интензивния йон е с m/z 191, следван от m/z 179 (66%). Това съединение съгласно литературните данни се идентифицира като 3,5-DCQA. При съединение **5**, най-интензивния йон също е с m/z 191, следван от m/z 179, който е с ниска интензивност (12%). Това е характерно за 1,5-DCQA. В MS^2 спектъра на съединение **6** най-интензивния йон е с m/z 173, следван от m/z 179 (73%) и m/z 191 (34%). Този MS^2 спектър наподобява спектъра на 3,4-DCQA, но относителната интензивност на йоните с m/z 179 и m/z 191 са по-ниски спрямо това в спектъра на 3,4-DCQA. Освен това липсва йона с m/z 335, което определя това вещество като 4,5-DCQA. Това съединение е в най-голямо количество в екстракта на билката от изомерните дикафеоилхинови киселини.

Общо дванадесет флавоноида и техните производни бяха открити в суровия екстракт от *T. Vulgare L.*. Идентифицирането на агликоновата част във флавоноид-О-глюкозидите и на флавоноид-О-глюкуронидите е направено чрез анализи на спектъра MS^2 и сравнение със съответните спектри в литературни източници (Таблица 1). Структурите на флавоноидите и флавоноидните агликони идентифицирани в екстракта са представени на фигура 17.



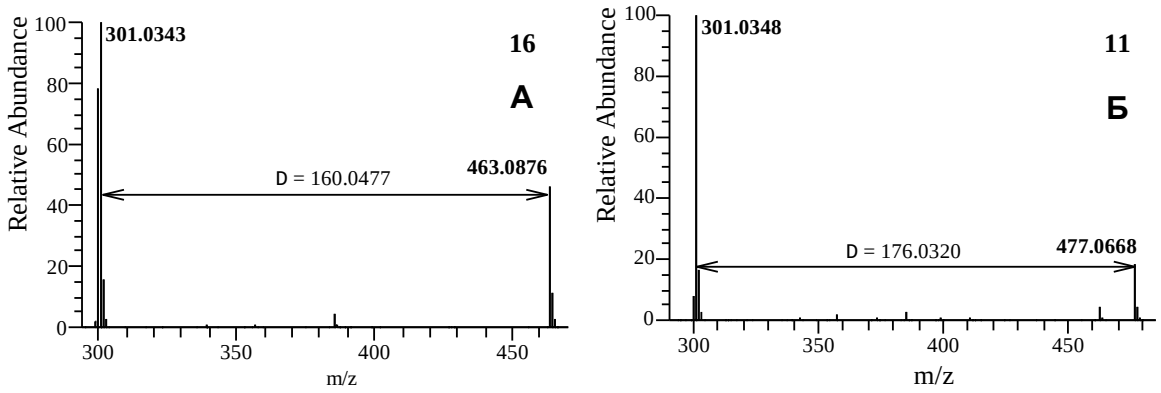
Фигура 16. MS^2 спектрите на съединенията **3 - 6**.



Фигура 17. Химичните структури на флавоноидите и флавоноидните агликони идентифицирани в суровия екстракт от *T. Vulgare L.*. А) Флавоноид в свободно състояние; Б) Флавоноид диметилетер; В) Флавоноид-О-глюкозид; Г) Флавоноид-О-глюкуронид.

От флавоноидите, които са в свободно състояние в екстракта, бяха регистрирани лутеолин, еупалитин и кверцетагетин диметилетер. От тях, лутеолинът е в най-голямо количество. Три флавоноид-О-глюкозида (съединения **16-18**) са регестрирани в екстракта. Това са кверцетин-3-О-глюкозид, лутеолин-7-О-

глюкозид (**16**) и кемпферол-О-(кафеоил)глюкозид (**18**). Типът на монозахаридния остатък може да бъде определен от разликата между масата на основните йони и масата на агликоновите фрагменти. Загубата на маса от 162 Da съответства на хексозид. Като пример на фигура 18-А е представен MS^2 спектъра на кверцетин-3-О-глюкозид (**16**). Съединението **18** е идентифицирано на база сравнение на получения от нас спектър с този представен в литературата [137].



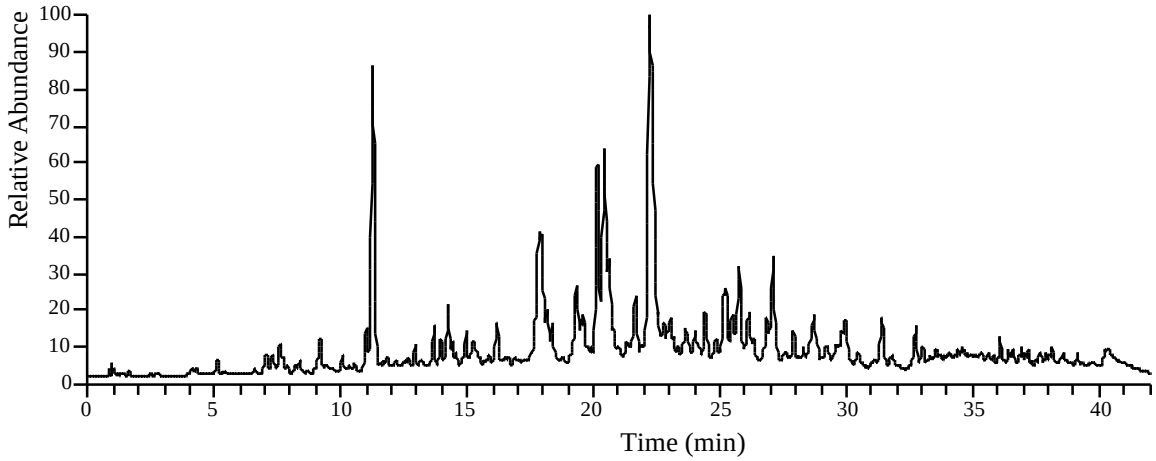
Фигура 18. MS^2 спектрите на А) кверцетин-3-О-глюкозид; Б) кверцетин-3-О-глюкуронид.

В екстракта идентифицирахме шест флавоноид-О-глюкурониди (съединения **10**-**15**). Това са ериодиктиол-О-глюкуронид (**10**), кверцетин-3-О-глюкуронид (**11**), лутеолин-7-О-глюкуронид (**12**), апигенин-7-О-глюкуронид (**13**), хомоериодиктиол-О-глюкуронид (**14**) и хрисоериол-7-О-глюкуронид (**15**). Характерно за глюкуронидите е загубата на маса от 176 Da при фрагментирането на молекулния йон. Илюстрация за това е MS^2 спектъра на кверцетин-3-О-глюкуронид (**11**), представен на фигура 18-Б. Като цяло, главните флавоноидни агликони във вратигата са лутеолин, кверцетин и апигенин. В най-голямо количество от флавоноидите е лутеолина, който присъства както в свободно състояние, така и под формата на глюкозид и глюкуронид.

В суровия екстракт на *T. Vulgare L.* е установено наличието на три органични киселини (глюконова, хининова и лимонена киселини) и пет неизвестни съединения, едно от които е производно на дихидроксибензоената киселина (съединение **25**).

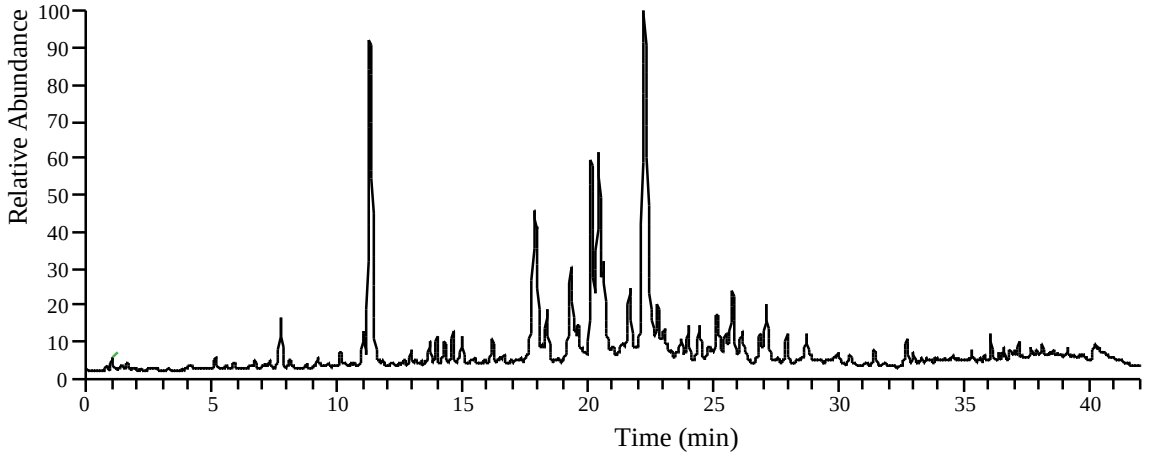
5.1.2 Характеризиране на съединенията в етилацетатната фракция от суровия екстракт (EACE)

Анализът на етилацетатната фракция чрез LC-HRMS (Фиг. 19) показва, че в органичната фаза са екстрахирани относително хидрофобните компоненти. Хидрофилни компоненти като глюконова, хининова и лимонена киселини не са установени в тази фракция. В тази фракция хидрофобните компоненти са концентрирани в сравнение със суровия екстракт.



Фигура 19. Обща йонна хроматограма (TIC) на етилацетатната фракция (EACE) от суровия екстракт на *T. Vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

5.1.3 Характеризиране на дициклохексиламониеви соли (DCHAS)



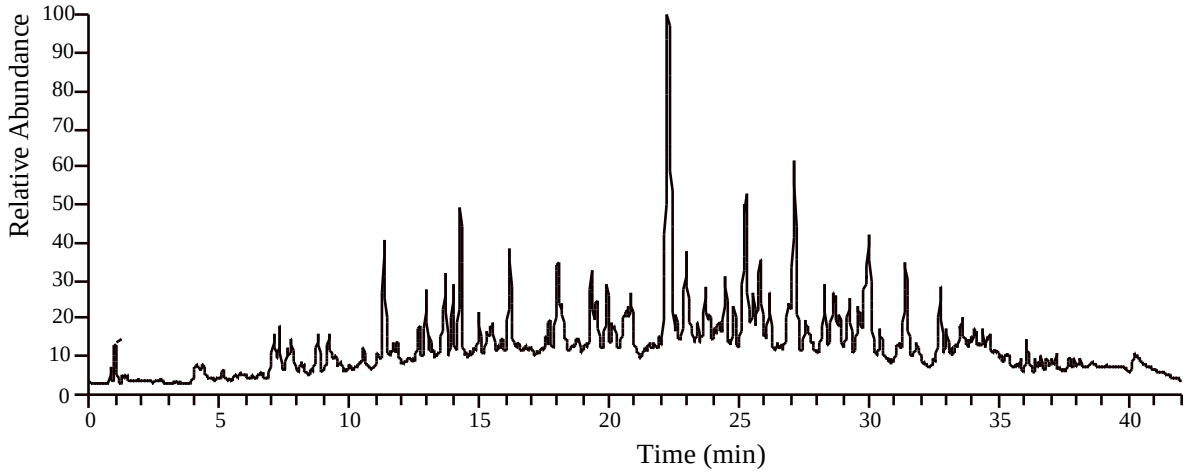
Фигура 20. Обща йонна хроматограма (TIC) на фракцията от дициклохексиламониеви соли (DCHAS) от суровия екстракт на *T. Vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

След концентриране на етилацетатната фракция от суровия екстракт на вратига се добавя дициклохексиламин. В резултат на реакцията се образува жълта утайка. Анализът на изсушеното твърдо вещество чрез LC-HRMS (Фиг. 20) показва наличието на 3- и 5-CQA, 3,4-, 3,5-, 1,5-, и 4,5-DCQA, флавоноид-О-глюкуронидите (съединения **10**-**15**) и лутеолин. Не са наблюдавани флавоноид-О-глюкозиди. Това е прост метод за отделяне на кисели вещества от други вещества, в частност изолиране на флавоноид-О-глюкурониди от сместа с флавоноид-О-хексозиди.

5.1.4 Характеризиране на твърдото вещество от диетилов етер/хексан (DEHS)

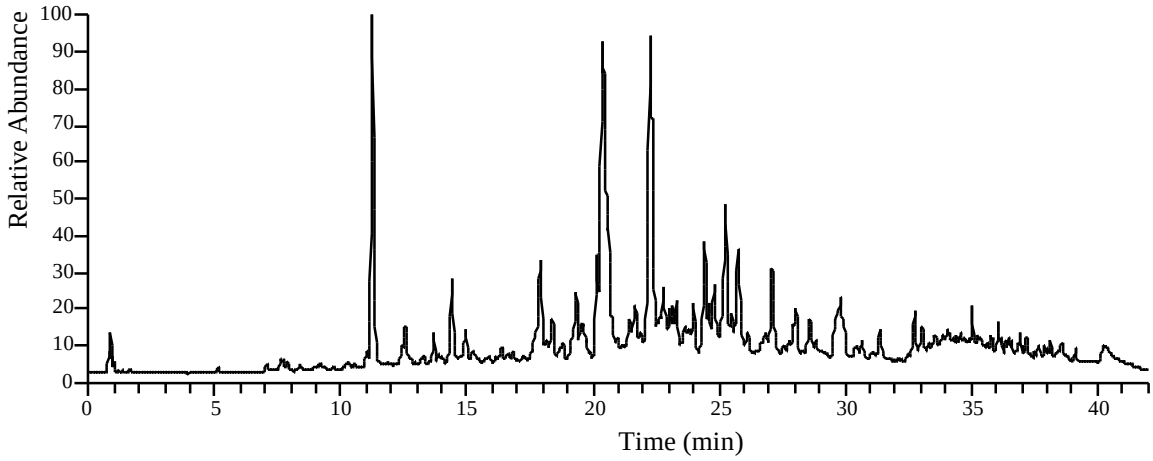
Полученото тъмножълто твърдо вещество от филтрата след утаяване с диетилов етер/хексан показва (Фиг. 21) наличието на кверцетагетин диметилов етер,

еупалитин, неизвестно съединение с m/z 457.21, остатъчно количество от 5-CQA, лутеолин, хомоериодиктиол-О-глюкуронид и други неидентифицирани съединения.



Фигура 21. Обща йонна хроматограма (TIC) на твърдото вещество от диетилов етер/ хексан (DEHS) от суровия екстракт на *T. Vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

5.1.5. Характеризиране на съединенията в етилацетатната фракция от цвета на вратига (EAFT)



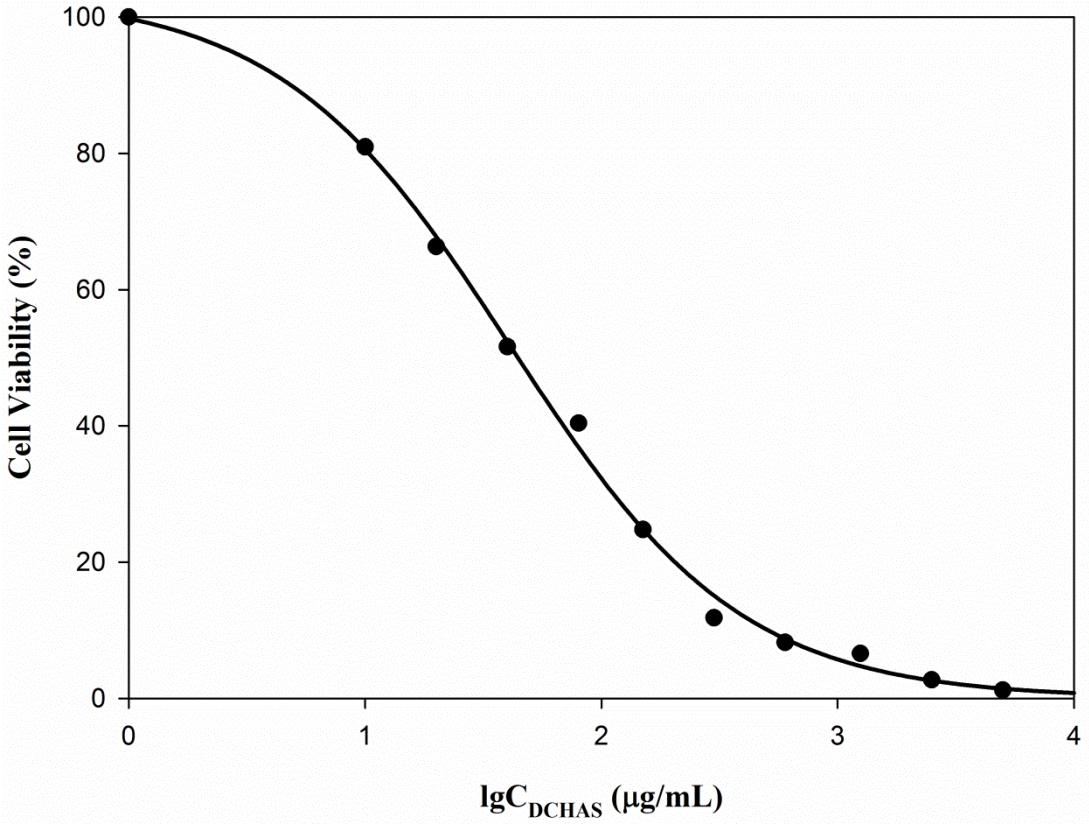
Фигура 22. Обща йонна хроматограма (TIC) на етилацетатната фракция (EAFT) от цвета на *T. Vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

Чрез LC-HRMS (Фиг. 22) установихме, че в етилацетатния екстракт хидрофобните компоненти се екстрахират по-ефективно, отколкото при традиционно използвания подход с използване на алкохолно-водна смес. В този екстракт не са открити хидрофилни компоненти като глюконова, хинова и лимонена киселини. Горният метод на извличане има някои предимства пред традиционно използвания подход при използване на алкохолно-водни смеси. Разделянето на хидрофилните и

относително хидрофобни компоненти протича в един етап, а танините практически не се екстрахират в органичната фаза.

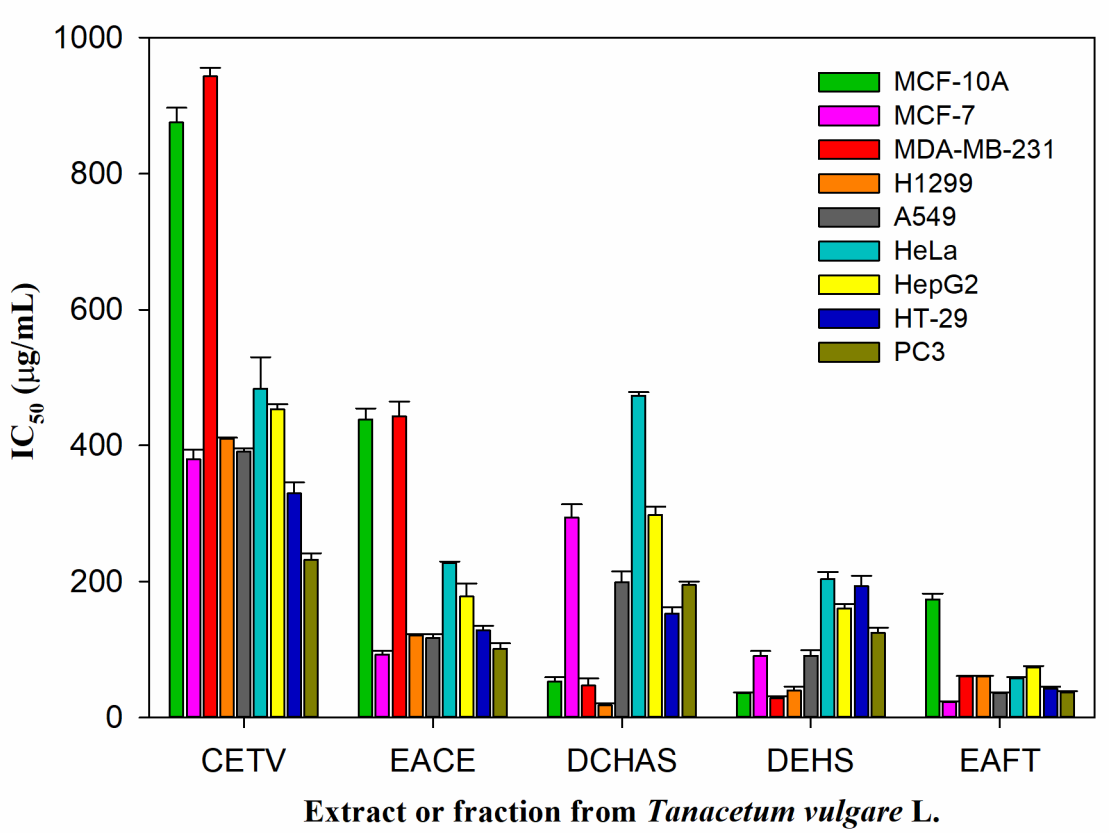
5.3 Антитуморна активност

Екстрактите и фракциите от вратига са тестирани в in vitro условия върху 9 човешки клетъчни линии - една нормална и осем туморни. Противотуморната активност се проследява след 72 часа инкубация със съответните субстанции при концентрации от 10 до 5000 μg/mL (два пъти нарастващи разреждания). Наблюдаваното антипролиферативно действие е концентрационно зависимо и има сигмоидална крива.



Фигура 23. Зависимост на преживяемостта на клетките от линията MDA-MB-231 от логаритъма от концентрацията на фракцията от дициклохексиламониеви соли**.**

Използвайки тези криви, бяха изчислени IC_{50} стойностите и стандартните отклонения (SD). Резултатите са представени на фиг. 24.
Както се вижда от фигура 24 най-ниска токсичност към нетуморогенната клетъчна линия проявява суровият екстракт CETV (IC_{50} = 875 ± 21.9 μg/mL). Етиласетатният екстракт EACE показва умерена токсичност (IC_{50} = 438 ± 16.8 μg/mL), а екстарктът EAFT проявява 2.5 пъти по-висок цитотоксичен ефект (IC_{50} = 174.1 ± 8.4 μg/mL). Фракциите DCHAS и DEHS проявяват значително по-висока токсичност в сравнение с останалите субстанции: 53 ± 6,4 и 36 ± 1,9 μg/mL, съответно.



Фигура 24. IC_{50} стойности, получени чрез MTT анализ, за екстракти и фракции от *T. Vulgare L.* след 72 часа инкубация на съответните клетъчни линии в присъствие на съответните агенти. Данните са представени като средни стойности от три независими експеримента ±SD. CETV - суров екстракт от *T. Vulgare L.*; EACE - етилацетатна фракция от суровия екстракт; DCHAS – фракция на дициклохексиламониеви соли; DEHS - твърдо вещество получено при използване на диетилов етер/хексан; EAFT - етилацетатен екстракт от цветовете на вратига.

Спрямо туморните клетки, най-ниско токсичен е суровият екстракт (IC_{50} от 231.9 до 943.0 µg/mL), а най-високо токсичен - етилацетатният екстракт от цветове на вратига (IC_{50} от 22.8 до 73.5 µg/mL). Етилацетатната фракция (EACE) е с близка токсичност за туморните клетки с изключение на тези от линията MDA-MB-231. Фракцията на дициклохексиламониевите соли на хлорогенните киселини и флавоноид-О-глюкуронидите оказва най-слаб ефект върху клетките от линията HeLa (IC_{50} 473.6 ± 5.10 µg/mL), а най-висок - върху H1299 (IC_{50}18 ± 3.4 µg/mL). Фракцията DEHS е силно токсична за клетките от линията MDA-MB-231 (IC_{50} 29.0 ± 2.1 µg/mL) и по-слабо за клетките от линията H1299 (IC_{50} 40.0 ± 5.2 µg/mL). Най-слабо чувствителната клетъчна линия към тази субстанция е HeLa (IC_{50} 203.7 ± 10.4 µg/mL). Етилацетатният екстракт (EAFT) проявява изразена цитотоксичност спрямо всички туморни клетъчни линии – IC_{50} от 22.8 ± 1.0 µg/mL за MCF-7 до 73.5 ± 2.4 µg/mL за HepG2. Най-чувствителната клетъчна линия спрямо изследваните субстанции е H1299.

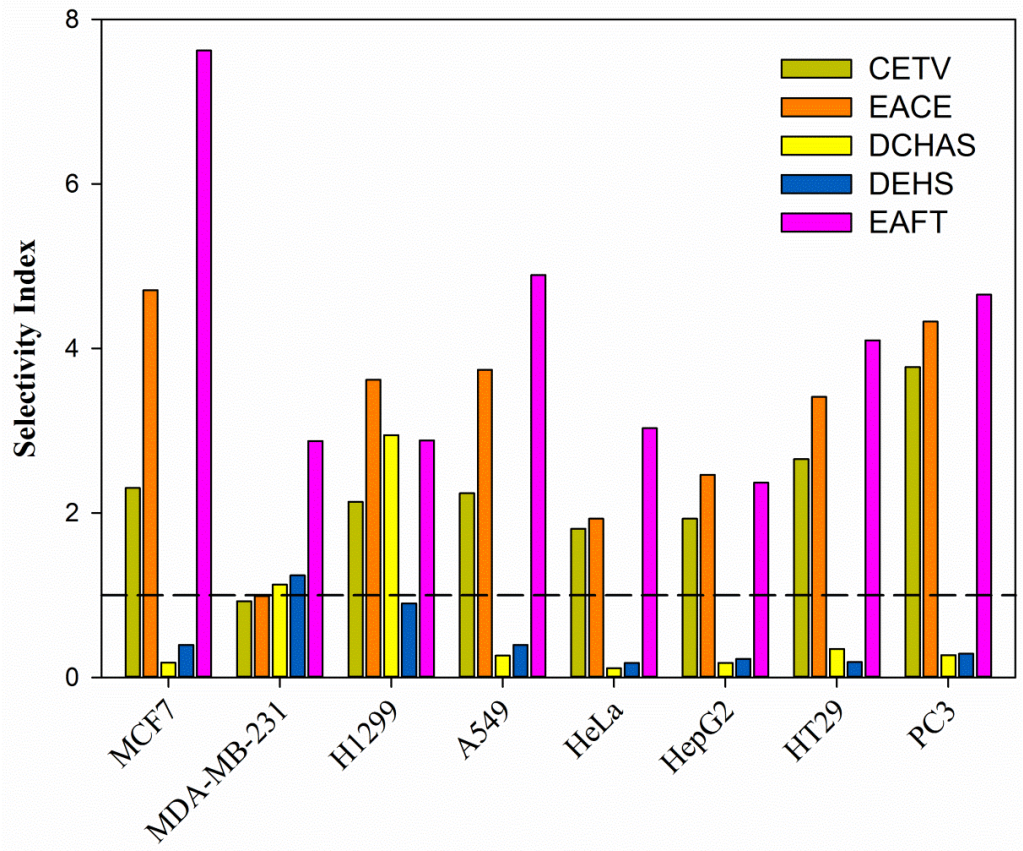
Изследванията на цитотоксичния ефект на тотален водно-етанолов екстракт от надземни части на *T. Vulgare L.* спрямо клетъчна линия MCF-7, са показали концентрационна зависимост на цитотоксичното му действие върху преживяемостта на туморните клетки, като IC_{50} е 286.8 μg/ml [128]. Според друго проучване на същата група автори [2], висока антитуморна активност спрямо клетъчна линия MCF-7 (IC_{50} = 28.0 μg/mL) и HeLa (IC_{50} = 47.7 μg/mL), проявява хлороформната фракция от цветове на *T. Vulgare L.* Съгласно нашите резултати IC_{50} на суровия екстаркт спрямо клетъчната линия MCF-7 е 380 ± 13.6 μg/mL, а за етилацетатната фракция от цветове на билката IC_{50} е 93 ± 5.7 μg/mL, а спрямо клетъчната линия HeLa IC_{50} е 227.1 ± 2.2 μg/mL. По високите стойности на IC_{50} установени при нашите изследвания се дължат от една страна на употребата на друг разтворител за екстракция - етилацетат вместо хлороформ, при което е извлечен различен набор от активни вещества. От друга страна, химическият състав на вратигата варира в зависимост от годината през която е събрана билката и мястото, на което вирее. При нашите експерименти, етилацетаният екстракт от цветове на вратига EAFT има по-висок цитотоксичен ефект, IC_{50} = 22.8 ± 1.0 μg/mL спрямо MCF-7 и съответно 57.5 ± 2.0 μg/mL спрямо HeLa. Освен посочените по-горе причини за получените разлики, трябва да се отбележи и спецификата на получаване на този екстракт.

За да намери практическо приложение в медицината, едно вещесто (природно или синтетично) или билков екстракт, от ключово значение са токсичността и страничните ефекти които могат да предизвикат тези субстанции. Ефективното противораково лекарство по възможност трябва да убие раковите клетки в пациентите, без съществено да засегне техните здрави клетки. Съществува относително надежден скрининг подход, който се основава на оценка на противораковата активност на различни съединения *in vitro*. Този подход се базира на селективността, като за количественото определяне на този параметър се използва индекса на селективност [142]. Индексът на селективност (SI) се изчислява като отношение на IC_{50} стойността за нормалната клетъчна линия и IC_{50} стойността за раковата клетъчна линия (уравнение 1), всяка получена при независим експеримент.

$$SI = \frac{IC_{50}\ (\text{normal cell line})}{IC_{50}\ (\text{cancer cell line})} \quad (1)$$

При използване на фаркцията DEHS, индексът на селективност е по-малък от единица за всички клетъчната линии с изключение на MDA-MB-231 (SI = 1.24), което означава, че тя е по-токсична за нормалните, отколкото за туморните клетки и съответно, не е подходяща за практическо приложение въпреки високата й цитотоксичност. Подобно стоят нещата и с фракцията DCHAS, при която индексът на селективност е по-голям от единица само за линиите MDA-MB-231 (1.13) и H1299 (2.94). Суровият екстракт има индекси на селективност над единица (от 1.80 за HeLa до 3.77 за PC3), като само за MDA-MB-231 стойността е по-малка от

единица (0.93). Като изключим клетъчните линии MDA-MB-231 и PC3, индексът на селективност за останалите варира в малък диапазон (1.80 - 2.65). При третиране на раковите клетките с етилацетатната фракция (EACE), всички SI > 1 с изключение на MDA-MB-231 (0.99). Стойностите на индекса на селективност за останалите клетъчни линии варират от 1.93 за HeLa до високи стойности като 4.33 и 4.71 съответно за PC3 и MCF-7. Най-висока селективност като цяло спрямо всички туморни клетъчни линии проявява етилацетатния екстракт (EAFT). Всички SI > 1, варирайки от 2.37 за HepG2 до много високата селективност спрямо MCF-7 за която SI е 7.62. Високи стойности на индекса на селективност са установени при клетъчните линии HT29 (4.10), PC3 (4.65) и A549 (4.89). Съгласно резултатите получени от Gospodinova и съавт. [2] селективността на хлороформната фракция от вратига спрямо MCF-7 е 6.4 и 3.8 спрямо HeLa. Спрямо последната клетъчна линия SI на екстракта EAFT получен от нас е 3.03.



Фигура 25. Индекс на селективност (SI) на туморни клетъчни линии. SI представлява отношението между IC_{50} за нормалната клетъчна линия MCF-10A и IC_{50} за раковите клетъчни линии, след 72-часово третиране.

На база получните от нас резултати за индексите на селективност можем да обобщим, че като цяло най-висока селективност на тестваните субстанции спрямо туморните клетъчни линии се наблюдава при MCF-7, а най-ниска при HeLa, MDA-MB-231 и HepG2. Анализът на резултатите показва, че най-висок потенциал като антитуморен агент има екстракта EAFT. Неговата цитотоксичност като цяло е най-

висока, а индексите на селективност са най-високите за всички туморни клетъчни линии, с изключение на H1299. Този екстракт би могъл да намери клинично приложение. Достатъчно висок потенциал като антитуморен агент има и фракцията EACE въпреки, че индексите на селективност са по-ниски от тези на EAFT, с изключение на клетъчната линия H1299. Тази фракция проявява по-слаба цитотоксичност в сравнение с етилацетатния екстракт EAFT. От тези резултати става ясно, че етилацетатните екстракт и фракция съдържат вещества с високоселективна активност към туморни клетки, като тези вещества са концентрирани в цвета на вратигата. В суровия екстракт, с изключение на някои хидрофилни съединения, главните компоненти са качествено същите както в етилацетатната фракция, но са в по-малко количество. От друга страна, сравнявайки химичния състав на етилацетатната фракция с този на етилацетатния екстракт, се наблюдава разлика в количественото отношение на главните компоненти, които са в по-големи количества в EAFT, с изключение на 3,4-DCQA. Има и няколко качествени разлики в химичния състав. Базирайки се на резултатите можем да кажем, че най-вероятно ефекта на химичните компоненти от екстарактите от *T. Vulgare L.* е синергичен. С увеличаване на количеството на активните компоненти в единица маса от твърдите субстанции се увеличава както цитотоксичността, така и индекса на селективност спрямо всички туморни клетъчни линии. От друга страна фракцията DEHS, получена при фракциониране на EACE, показва силна цитотоксичност (втора, след EAFT) и SI < 1 с едно изключение. Другата фракция - DCHAS, както бе споменато включва хлорогенните киселини и флавоноид-О-глюкурониди. При използване на тази фракция индекса на селективност е по-голям от единица само при две клетъчни линии. Този резултат не е изненадващ с оглед на факта, че гликозилирането на флавоноидите води до намаляване на антитуморната им активност [143].

Биологичната активност *in vitro* и *in vivo* зависи не само от концентрацията на тестираните съединения, но и от техните метаболити, както и от присъствието на други вещества. Така например, екзогенни полифенолни антиоксиданти показват противоречиви резултати, като вида, дозировката и матрицата на тези антиоксиданти могат да бъдат определящи фактори за повлияване на баланса между полезни и вредни ефекти от тези естествени съединения [144]. Някои флавоноиди, като например много популярния като антиоксидант флавоноид кверцетин, при по-високи концентрации става про-оксидант [145]. Важно е да се проучи антитуморният ефект на отделните съединения в екстракта от етилацетат, за да се идентифицират основните активни вещества.

5.4 Инхибиране на постпролин-специфична ензимна активност

Изследванията за идентифициране на протеолитични ензими, маркери за патологични процеси, могат да доведат до разработването на нови средства за терапия с висока ефективност и добра биологична поносимост. Протеазите са считани за привлекателни терапевтични мишени. Пролиновият остатък в

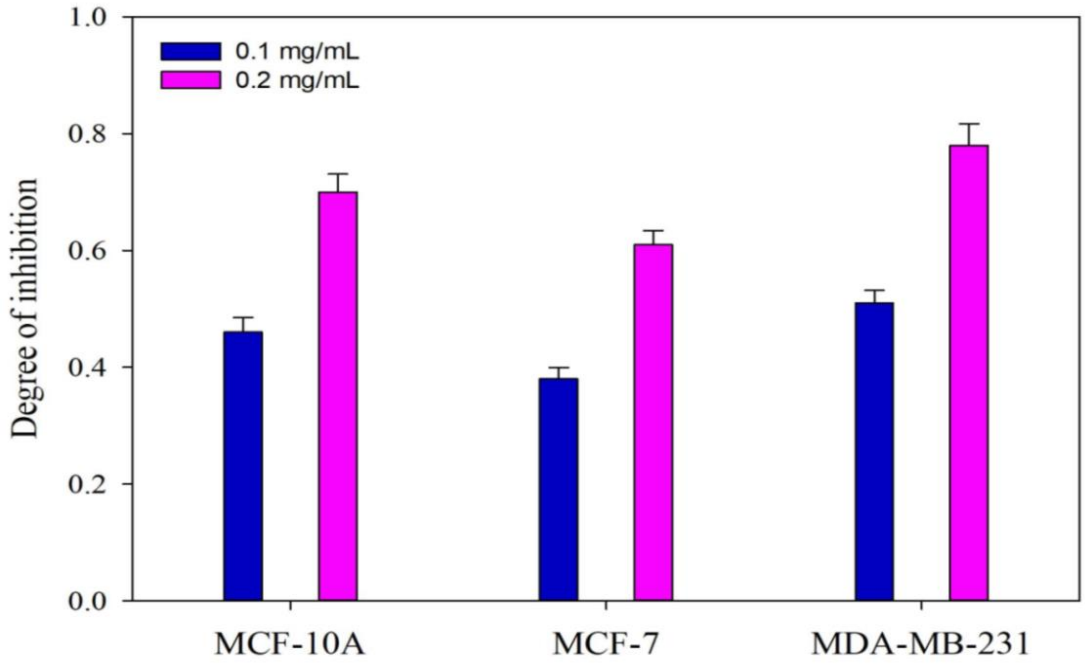
структурата на пептиди и белтъци налага конформационни ограничения на аминокиселинната верига. Хидролизата на пептиди и белтъци при пролинов остатък се осъществява от малко на брой пролин-специфични протеази. От известните човешки протеази ние се насочихме към дипептидилпептидаза IV (DPP-IV), фибробласт активиращ протеин α (FAP) и пролилолигопептидаза (POP). Те са постпролин-специфични серинови протеази и проявяват сходства в своето каталитично поведение. Повишените нива на активност на тези ензими се наблюдават при различни патологични състояния, включително злокачествени заболявания. Предполага се, че постпролин-специфичните протеази участват в патологичните процеси чрез разграждане на пролин-съдържащи пептиди. Въпреки, че са направени редица фундаментални изследвания, в много случаи тяхната точната роля за възникването и прогресията на различни заболявания, включително и рак, остава неизяснена. Това прави техните селективни инхибитори интересни с оглед на фундаментални изследвания и като потенциални терапевтични средства. Основен проблем за намиране на селективни инхибитори за тези ензими е, че те имат близки по структура активни центрове и каталитичните им центрове са с много близка пространствена организация.

Един важен подход към решаване на редица медицински проблеми е намирането на ефективни лекарства на основата на природни вещества. В частност това се отнася за намирането на селективни инхибитори за DPP-IV, FAP и POP. Установено е например, че някои флавоноиди и кафеоилхинови киселини (хидроксицинамоил-хинови киселини), както и техни производни са инхибитори на POP и са с добра селективност спрямо DPP-IV [91, 146]. Съгласно литературни данни такъв тип съединения са установени в екстракти от *T. Vulgare L.*, които са потенциални инхибитори на постпролин-специфичните пептидази.

Изследвахме ефекта на суровият екстракт от *Tanacetum vulgare* L., осигурен от фирма Вемо 99 ООД върху постпролин-специфичната ензимна активност в три човешки клетъчни линии (MCF-10A, MCF-7 и MDA-MB-231) при използване на неспецифичен флуорогенен субстрат Z-Gly-Pro-AMC. Тестваните екстракти са с концентрации 0.1 mg/mL и 0.2 mg/mL. Във всичките три клетъчни линии се наблюдава концентрациионно зависимо инхибиране (Фиг. 26), като степента на инхибиране в MDA-MB-231 е най-висока: 0.40 при концентрация 0.1 mg/mL и 0.61 при 0.2 mg/mL. Най-ниската степен на инхибиране е наблюдавана в MCF-7: 0.30 при концентрация 0.1 mg/mL и 0.48 при 0.2 mg/mL съответно. От гледна точка на получените резултати може да се заключи, че суровият екстракт от *T. Vulgare L.* има изразен дозозависим инхибиторен ефект върху ензимната активност на хомогенати от клетки на рак на гърдата. По-подробни изследвания са необходими за скрининг на активните съединения.

Клетъчната линия MDA-MB-231 (троен негативен човешки карцином на млечната жлеза) обикновено се използва като отрицателна контрола за FAP, тъй като е известно, че липсва такава ензимна активност [147, 141]. Проучихме ефекта на суровият екстракт от билката върху ензимната активност спрямо рекомбинантна DPP-IV, с използване на селективния флуорогенен субстрат Gly-Pro-AMC. От получените данни може да се заключи, че този екстакт практически не инхибира

DPP-IV. Това означава, че компонентите в екстаркта на вратига са високо селективни инхибитори. От друга страна, поради липсата на FAP-активност в клетките MDA-MB-231 показва, че в нашето изследване се наблюдава инхибиране само на активността на POP. За нас представляваше интерес да разберем кои типове съединения са отговорни за инхибирането. Ние фракционирахме суровия екстракт чрез използване на двуфазна система вода и етилацетат (вж. **5.1.**). Изследван бе ефектът на водната и органичната фракции върху постпролин-специфичната ензимна активност в хомогенат на клетъчната линия MDA-MB-231.

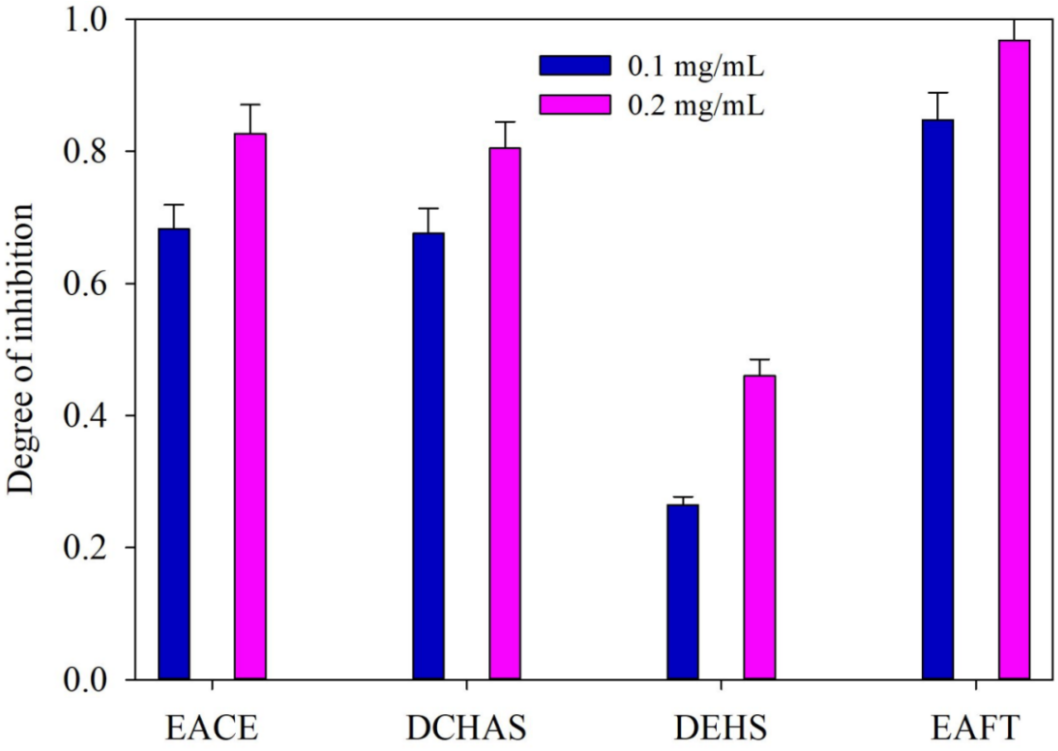


Фигура 26. Степен на инхибиране на постпролин-специфичната ензимна активност от суровия екстракт от *Tanacetum vulgare* L. в хомогенати от три човешки клетъчни линии.

Етилацетатната фракция показва по-висока активност (0.68 степен на инхибиране при концентрация 0.1 mg/mL и 0.83 при 0.2 mg/mL съответно) (Фиг. 27) в сравнение със тази на суровия екстракт (Фиг. 26). От друга страна, водната фракция показва много ниска активност. Изследванията с LC-HRMS показваха, че етилацетатната фракция съдържа по-висока концентрация на главните нелетливи съединения в сравнение с тяхната концентрация в суровия екстракт (вж. **5.2.**).

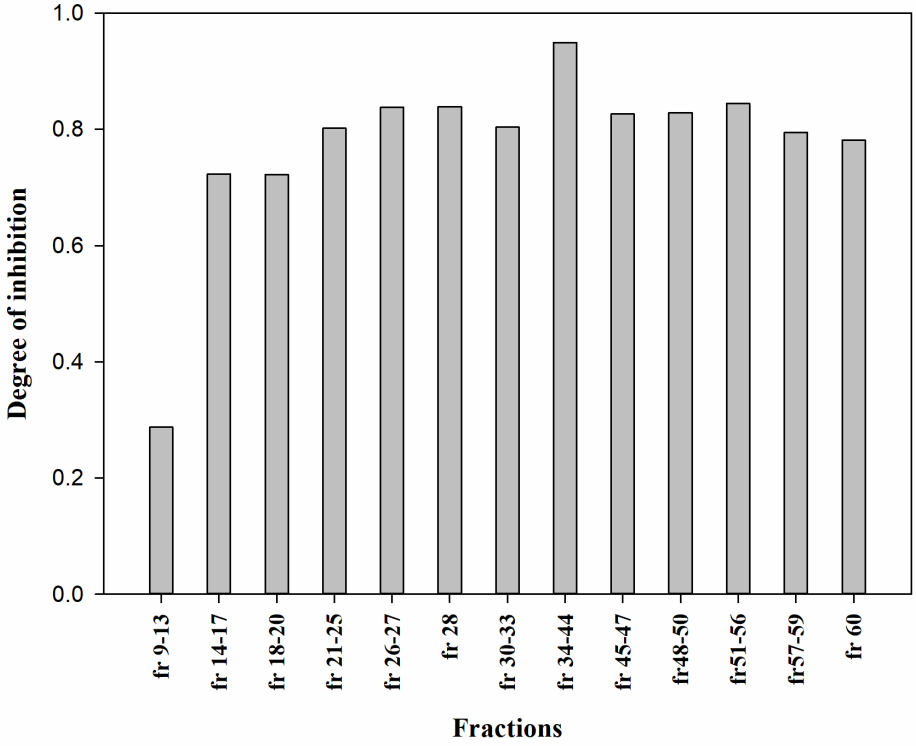
От тези данни можем да заключим, че някои от тези съединения са ефективни инхибитори на постпролин ендопептидазната активност, съответно за POP. Следващата стъпка бе изследване на инхибиращия потенциал на фракциите получени при разделяне на веществата от етилацетаната фракция (вж. **5.1.**). Това са фракцията от дициклохексиламониеви соли (DCHAS) и утайката получена при третиране на филтрата със смес от диетилов етер и хексан (DEHS). Инхибиращата

активност на DCHAS се оказва практически същата като активността на етилацетатната фракция (Фиг. 27). От своя страна, фракцията DEHS показа слаб инхибиращ ефект. Така при концентация на субстанциите 0.1 mg/mL, степента на инхибиране е два пъти по-ниска в сравнение с етилацетатната фракцията EACE (Фиг. 27). Тези резултати потвърждават нашата хипотеза, че някои от основните компоненти в екстракта са потенциални селективни инхибитори на POP. Етилацетатният екстракт (EAFT) получен при обработка на цвета на растението с двуфазна система вода/етилацетат, показа най-висок ефект по отношение на степента на инхибиране на активността на постпролин ендопептидазата (Фиг. 27). При този екстаркт степента на инхибиране при концентрация 0.1 mg/mL е 0.85, а при концентрация 0.2 mg/mL, съответно 0.97. В този екстаркт количеството на основните компоненти на единица маса е най-висок и това обяснява наблюдаваните количествени резултати.

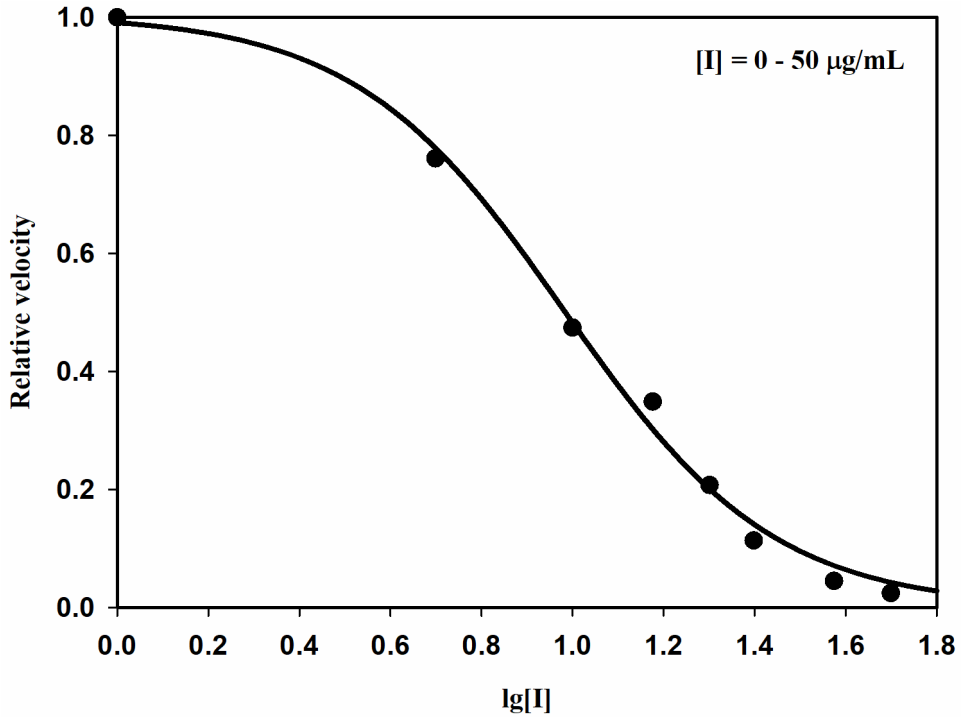


Фигура 27. Инхибиращ ефект на отделните фракции върху постпролин-специфичната ензимна активност в хомогената от MDA-MB-231 клетъчната линия. EACE - етилацетатна фракция от суровия екстракт от вратига; DCHAS - фракция от дициклохексиламониеви соли; DEHS – утайка получена в смес от диетилов етер и хексан; EAFT - етилацетатен екстракт от цветове на вратига.

Екстрактът беше разделен на отделни фракции чрез обърнатофазова флаш-хроматография и тяхната инхибираща активност беше изследвана върху хомогената от линията MDA-MB-231. Получените резултатите са представени на фигура 28.



Фигура 28. Степен на инхибиране на пролин-специфичната ензимна активност от фракции от екстракта от вратига в хомогенат от MDA-MB-231. Концентрацията на фракциите в инкубационната среда е 100 μg/mL.



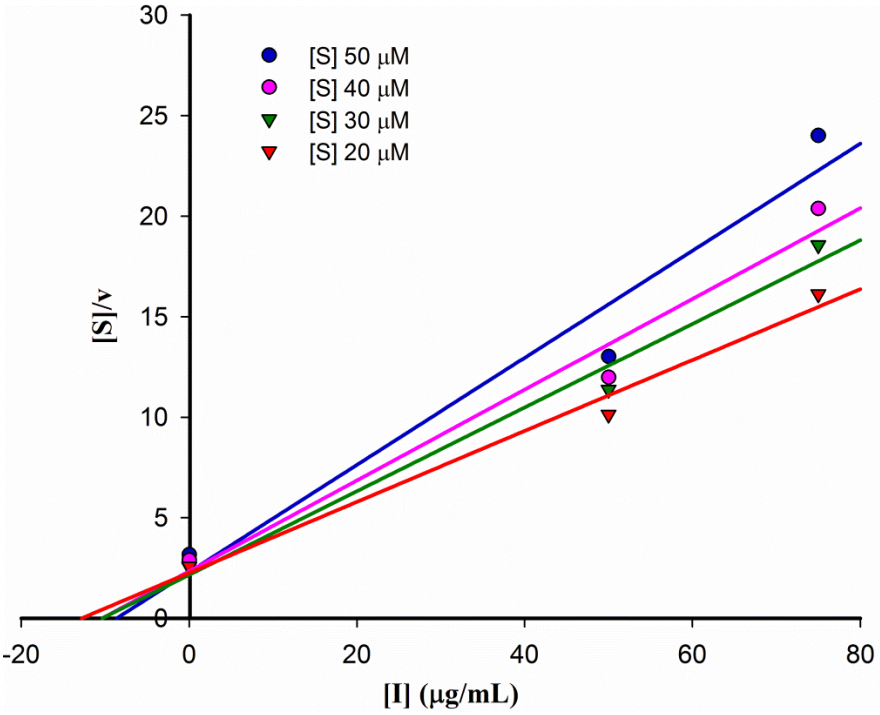
Фигура 29. Относителна скорост на хидролиза на Z-Gly-Pro-AMC от хомогенат от клетки на MDA-MB-231 в присъствие на различни концентрации от фракции 34 – 44.

Фракциите от 14-та до 60-та показват много висока степен на инхибиране - между 0.7 и 0.95. Фракциите 34 - 44 имат най-голям ефект, при които наблюдаваната степен на инхибиране е 0.95. Получените фракции съдържат главните компоненти на вратигата – хлорогенни киселини и О-гликозилирани флавоноиди.

Беше изследвана зависимостта на постпролин-специфичната ензимна активност на хомогената от клетъчната линия MDA-MB-231 от концентрацията на фракциите 34 – 44.

Получената зависимост на относителната начална скорост на реакцията от логаритъма от концентрацията на фракциите е представена на фигура 29. От получената типична сигмоидна зависимост е изчислена концентрацията на полуинхибиране IC_{50}, която е 10 µg/mL.

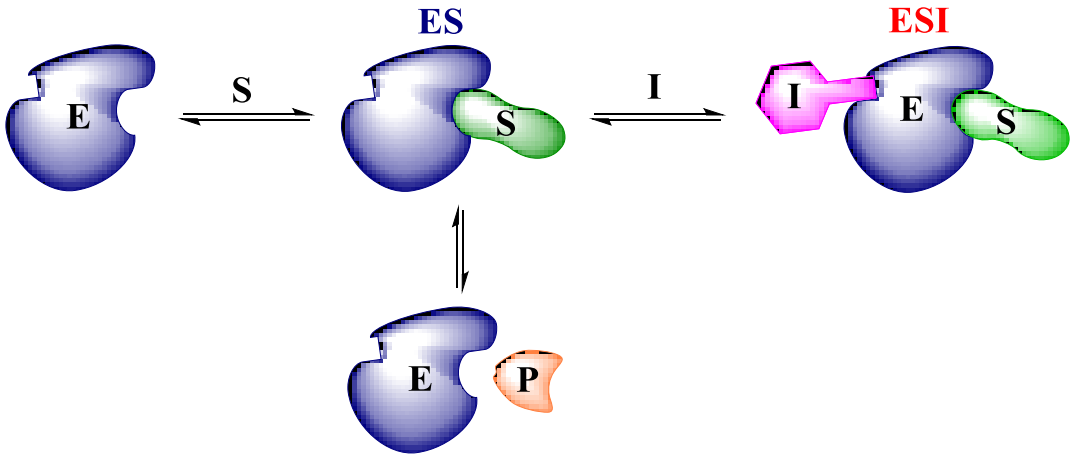
Проведохме експерименти за определяне на типа на инхибиране от тези фракции, както и за определяне на привидната инхибиторна константа. И в този случай използвахме неспецифичния флуорогенен субстрат Z-Gly-Pro-AMC. Получените данни са представени в координати на Dixon (Фиг. 30). Съгласно вида на графиката типът на инхибиране е безконкурентен. Стойността на привидната K_i е 3.2 µg/mL.



Фигура 30. Графика на Dixon за определяне на типа на инхибиране на постпролин-специфичната ензимна активност в хомогенат от MDA-MB-231.

Схемата на осъществяване на безконкурентно инхибиране е представена на фигура 31. Безконкурентните инхибитори взаимодействат само с ензим-субстратния комплекс (ES). Инхибиторът се свързва в алостеричен център на ензима в структурата на ES-комплекс. Това предизвиква променя на конформацията на ензима. Свързването на инхибитора стабилизира ES-комплекса, което прави по-

трудна дисоцияцията на субстрата и/или затруднява преобразуването му в продукт, както и отделянето на формирания продукт от активния център на ензима.



Фигура 31. Принцип на безконкурентното инхибиране.

Този начин на инхибиране е привлекателен за дизайна на лекарствени субстанции, тъй като инхибиторите се свързват с ензимната мишена само когато ензимът е активен и присъства субстрат. Много близката структурна организация на изследваните от нас ензими, значително затруднява намирането на селективни конкурентни инхибитори. В този контекст, безконкурентните инхибитори които се съдържат във вратигата, са перспективни и с потенциал за практическо приложение.

6. ИЗВОДИ

Анализът на суровия екстракт на *Tanacetum vulgare* L. е извършен чрез течна хроматография, съчетана с мас-спектрометрия с висока разделителна способност (LC-HRMS) в режим на отрицателна йонизация. Установено е наличието на 26 основни нелетливи съединения в екстракта: от тях шест хлорогенни киселини и дванадесет флавоноида и техни гликозилирани производни. Потенциалните биоактивни компоненти на билката са концентрирани чрез екстрахиране с етилацетат.

Екстрактите и фракциите от вратига са изследвани в *in vitro* условия върху 9 човешки клетъчни линии, осем от които са туморни. Най-ниска цитотоксичност към нетуморогенната клетъчна линия проявява суровият екстракт, а най-висока - субстанцията, получена при утаяване в смес от диетилов етер/хексан. Спрямо туморните клетки най-ниско цитотоксичен е суровият екстракт, а най-високо цитотоксичен - етилацетатният екстракт от цветове на вратига.

С най-висок индекс на селективност е етилацетатният екстракт от цветове на вратига, следван от етилацетатната фракция. Суровият екстракт има индекси на селективност над единица, но те са по-ниски от тези на етилацетатните извлеци, които концентрират веществата със селективна антитуморна активност.

С увеличаване на количеството на активните компоненти в етилацетатните извлеци спрямо суровия екстракт, се увеличават цитотоксичността и селективността спрямо всички туморни клетъчни линии. От друга страна, фракциите от дициклохексиламониевите соли и утайката от диетилов етер/хексан показват силна цитотоксичност и индекс на селективност по-малък от единица. Най-вероятно ефектът на химическите компоненти от екстарактите от *T. Vulgare L.* е синергичен.

Изследван е ефектът на инхибиране на суровия екстракт от *T. Vulgare L.* върху постпролин-специфичната ензимна активност в хомогенати от три човешки клетъчни линии (MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231). Най-висока степен на инхибиране се наблюдава при MDA-MB-231, а най-ниска - при MCF-7.

Степента на инхибиране на постпролин-специфичната ензимна активност в хомогенат на клетъчната линия MDA-MB-231 намалява в реда: етилацетатен екстракт > етилацетатна фракция > дициклохексиламониевите соли, като типът на инхибиране е безконкурентен. Компонентите в етилацетатните извлеци от *T. Vulgare L.* са високо селективни инхибитори за пролилолигопептидазата и имат потенциал да бъдат използвани като терапевтични средства при карцином на млечната жлеза.

7. ПРИНОСИ

Предложихме ефективен метод за извличане на биологично активните съединения от *T. Vulgare L.* чрез екстракция в система етилацетат/вода с pH 3. Предимствата на този метод са: разделяне на хидрофобни от хидрофилни вещества в един етап; хидрофобните компоненти се екстрахират по-ефективно, отколкото при традиционно използвания подход (алкохолно-водна смес); в органичната фаза практически не се екстрахират танини.

Предложихме ефективен метод за отделяне на съединенията с киселинен характер от останалите съединения, базиран на образуването на малко разтворими дициклохексиламониеви соли.

Нашите изследвания показаха много висока селективност по отношение на инхибирането на пролилолигопептидазата спрямо дипептидилпептидаза IV. Безконкурентните инхибитори, каквито са компонентите в екстрактите от *T. Vulgare L.*, са привлекателни за дизайна на лекарствени субстанции, тъй като се свързват с ензима-мишена само, когато ензимът е активен и присъства субстрат, и са с потенциал за практическо приложение.

8. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

8.1 Научни публикации по темата на дисертацията:

• **Vasileva A**, Ivanov I, Mitev V. Healing properties and application of Tanacetum vulgare in medicine. (Systems, Criteria and Standards for Measuring and Assessing the Quality of Health ServiceS). MILITARY MEDICINE. 2018, 70(4): 3-8.

• **Vasileva A**, Ivanov I, Dimitrova M, Lozanov V, Mitev V. Inhibitory Effects of Tansy on Postproline Cleaving Enzyme Activity in Breast Cancer Cells. Proceedings of the thirteenth workshop biological activity of metals, synthetic compounds and natural products 19-21 november, 2018. (приета за печат)

• **Vasileva A**, Iliev I, Lozanov V, Dimitrova M, Mitev V, Ivanov I. In vitro study on the antitumor activity of Tanacetum vulgare L. extracts. Bulg. Chem. Commun. 2019, 50(2). (приета за печат)

8.2 Участия в научни форуми във връзка с темата на дисертацията:

• Lozanova V, **Vasileva A**, Sugareva P, Hristov Y, Ivanov I, Mitev V. Assessment of the chlorogenic acid profile of Tanacetum vulgare L. (Tansy). XVI International Congress of Medical Sciences (ICMS 2017), Sofia, Bulgaria, 11-14 May 2017

• Velinov L, Ivanov I, **Vasileva A**, Aleksandrova D, Ruseva S. Natural inhibitors of Fibroblast Activation Protein α. XVI International Congress of Medical Sciences (ICMS 2017) , Sofia, Bulgaria, 11-14 May 2017

• **Василева А**, Димитрова М, Лозанов В, Митев В, Иванов И. Химичен състав и инхибиращи ефекти на Tanacetum vulgare L. върху пролин-специфичната ензимна активност в клетъчни линии от рак на гърдата. Дванадесета работна среща с международно електронно участие "Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти", Българска Академия на Науките, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ), 27-29 ноември 2017

• **Василева А**, Димитрова М, Лозанов В, Митев В, Иванов И. Инхибиторен ефект на вратига върху постпролин-специфичната ензимна активност в клетки от рак на гърдата. Тринадесета работна среща с международно електронно участие "Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти", Българска Академия на Науките, Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей (ИЕМПАМ), 19-21 ноември 2018

8.3 Участия в проекти във връзка с дисертационния труд:

• „Дизайн, синтез и приложение в медицината и биологията на нов флуорогенен субстрат и на специфични инхибитори за аминопептидаза А“, СМН, член на колектива, 12/2015г.

• „Молекулен дизайн на специфични субстрати и инхибитори на фибробласт активиращ протеин α – маркерен ензим за малигнени заболявания“, Фонд "Научни изследвания" на Министерството на образованието и науката на Република България, член на колектива, ДФНИ-Т02-25/2015г.

• „Идентифициране и биохимично охарактеризиране на хидроксицинамоилхинови киселини и флавоноиди от *Tanacetum vulgare* L. като потенциални терапевтични средства“, изпълнител-докторант на проекта, № Д-129/2018 от конкурса „Млад изследовател“ към Съвета по медицински науки.

9. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Onuchak LA, Pariichuk NV, Arutyunov YI, Pavlova LV. Headspace Gas Chromatographic Analysis of Volatile Components of Common Tansy (Tanacetum vulgare L.) and Its Preparations. Journal of Analytical Chemistry. 2018 Oct 1;73(10):1003-13

2. Gospodinova Z, Bózsity N, Ocsovszki I, Orbán-Gyapai O, Krasteva M, Zupkó I. Chloroformic fraction of Tanacetum vulgare L. induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF7 cells. Int J Pharma Sci. 2015;5(2):986-0

3. Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW. Polyphenols as small molecular inhibitors of signaling cascades in carcinogenesis. Pharmacology & therapeutics. 2011 Jun 1;130(3):310-24

4. Neergheen VS, Bahorun T, Taylor EW, Jen LS, Aruoma OI. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. Toxicology. 2010 Dec 5;278(2):229-41

5. Misumi Y, Ikehara Y. Dipeptidyl-peptidase IV. InHandbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition) 2013 (pp. 3374-3379)

6. Gorrell MD, Park JE. Fibroblast activation protein α. InHandbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition) 2013 (pp. 3395-3401)

7. Ito K, Nakajima Y, Yoshimoto T. Prolyl oligopeptidase. InHandbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition) 2013 (pp. 3360-3364)

8. Juillerat-Jeanneret L, Tafelmeyer P, Golshayan D. Fibroblast activation protein-α in fibrogenic disorders and cancer: more than a prolyl-specific peptidase?. Expert opinion on therapeutic targets. 2017 Oct 3;21(10):977-91

9. Vliegen G, Raju TK, Adriaensen D, Lambeir AM, De Meester I. The expression of proline-specific enzymes in the human lung. Annals of translational medicine. 2017 Mar;5(6)

10. Rosenblum JS, Kozarich JW. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. Current opinion in chemical biology. 2003 Aug 1;7(4):496-504

11. Kelly T, Huang Y, Simms AE, Mazur A. Fibroblast activation protein-α: a key modulator of the microenvironment in multiple pathologies. InInternational review of cell and molecular biology 2012 Jan 1 (Vol. 297, pp. 83-116). Academic Press

12. Puré E, Blomberg R. Pro-tumorigenic roles of fibroblast activation protein in cancer: back to the basics. Oncogene. 2018 May 3:1

13. Zi F, He J, He D, Li Y, Yang L, Cai Z. Fibroblast activation protein α in tumor microenvironment: recent progression and implications. Molecular medicine reports. 2015 May 1;11(5):3203-11

14. Hu M, Qian C, Hu Z, Fei B, Zhou H. Biomarkers in tumor microenvironment? Upregulation of fibroblast activation protein-α correlates with gastric cancer progression and poor prognosis. Omics: a journal of integrative biology. 2017 Jan 1;21(1):38-44

15. Yazbeck R, Jaenisch SE, Abbott CA. Potential disease biomarkers: dipeptidyl peptidase 4 and fibroblast activation protein. Protoplasma. 2018 Jan 1;255(1):375-86

16. Плешкан ВВ, Алексеенко ИВ, Тюлькина ДВ, Кузьмич АИ, Зиновьева МВ, Свердлов ЕД. Белок активации фибробластов fap как возможная мишень в противоопухолевой стратегии. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016;34(3)

17. Christiansen VJ, Jackson KW, Lee KN, Downs TD, McKee PA. Targeting inhibition of fibroblast activation protein-α and prolyl oligopeptidase activities on cells common to metastatic tumor microenvironments. Neoplasia. 2013 Apr 1;15(4):348-58

18. Hamson EJ, Keane FM, Tholen S, Schilling O, Gorrell MD. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. PROTEOMICS–Clinical Applications. 2014 Jun;8(5-6):454-63

19. Aertgeerts K, Ye S, Tennant MG, Kraus ML, Rogers J, Sang BC, Skene RJ, Webb DR, Prasad GS. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV in complex with a decapeptide reveals details on substrate specificity and tetrahedral intermediate formation. Protein science. 2004 Feb 1;13(2):412-21

20. Chien CH, Huang LH, Chou CY, Chen YS, Han YS, Chang GG, Liang PH, Chen X. One site mutation disrupts dimer formation in human DPP-IV proteins. Journal of Biological Chemistry. 2004 Sep 24

21. Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. Critical reviews in clinical laboratory sciences. 2003 Jan 1;40(3):209-94

22. Vanhoof G, Goossens FD, De Meester I, Hendriks D, Scharpe S. Proline motifs in peptides and their biological processing. The FASEB Journal. 1995 Jun;9(9):736-44.65

23. Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. European journal of cell biology. 2003 Feb 1;82(2):53-73

24. Hinke SA, Pospisilik JA, Demuth HU, Mannhart S, Kühn-Wache K, Hoffmann T, Nishimura E, Pederson RA, McIntosh CH. Dipeptidyl Peptidase IV (DPIV/CD26) Degradation of Glucagon CHARACTERIZATION OF GLUCAGON DEGRADATION PRODUCTS AND DPIV-RESISTANT ANALOGS. Journal of Biological Chemistry. 2000 Feb 11;275(6):3827-34

25. Reinhold D, Bank U, Bühling F, Kähne T, Kunt D, Faust J, Neubert K, Ansorge S. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV (DP IV, CD26) specifically suppress proliferation and modulate cytokine production of strongly CD26 expressing U937 cells. Immunobiology. 1994 Dec 1;192(1-2):121-36

26. Flentke GR, Munoz E, Huber BT, Plaut AG, Kettner CA, Bachovchin WW. Inhibition of dipeptidyl aminopeptidase IV (DP-IV) by Xaa-boroPro dipeptides and use of these inhibitors to examine the role of DP-IV in T-cell function. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1991 Feb 15;88(4):1556-9

27. Yamochi T, Yamochi T, Aytac U, Sato T, Sato K, Ohnuma K, McKee KS, Morimoto C, Dang NH. Regulation of p38 phosphorylation and topoisomerase IIα expression in the B-cell lymphoma line Jiyoye by CD26/dipeptidyl peptidase IV is associated with enhanced in vitro and in vivo sensitivity to doxorubicin. Cancer research. 2005 Mar 1;65(5):1973-83

28. Ho L, Aytac U, Stephens LC, Ohnuma K, Mills GB, McKee KS, Neumann C, LaPushin R, Cabanillas F, Abbruzzese JL, Morimoto C. In vitro and in vivo antitumor effect of the anti-CD26 monoclonal antibody 1F7 on human CD30+ anaplastic large cell T-cell lymphoma Karpas 299. Clinical Cancer Research. 2001 Jul 1;7(7):2031-40

29. Hughes TE, Mone MD, Russell ME, Weldon SC, Villhauer EB. NVP-DPP728 (1-[[[2-[(5-cyanopyridin-2-yl) amino] ethyl] amino] acetyl]-2-cyano-(S)-pyrrolidine), a slow-binding inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. Biochemistry. 1999 Sep 7;38(36):11597-603

30. Tanaka S, Suzuki K, Sakaguchi M. The prolyl oligopeptidase inhibitor SUAM-14746 attenuates the proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. Breast Cancer. 2017 Sep 1;24(5):658-66

31. Nomura K. Specificity of prolyl endopeptidase. FEBS letters. 1986 Dec 15;209(2):235-7

32. Toide K, Shinoda M, Iwamoto Y, Fujiwara T, Okamiya K, Uemura A. A novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, with potential for treating Alzheimer's disease. Behavioural brain research. 1997 Feb 1;83(1-2):147-51

33. Rea D, Fülöp V. Structure-function properties of prolyl oligopeptidase family enzymes. Cell biochemistry and biophysics. 2006 Oct 1;44(3):349-65.

34. Babkova K, Korabecny J, Soukup O, Nepovimova E, Jun D, Kuca K. Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors. Future medicinal chemistry. 2017 Jun;9(10):1015-38

35. Tarragó T, Kichik N, Claasen B, Prades R, Teixidó M, Giralt E. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. Bioorganic & medicinal chemistry. 2008 Aug 1;16(15):7516-24

36. Penttinen A, Tenorio-Laranga J, Siikanen A, Morawski M, Roßner S, Arturo Garcia-Horsman J. Prolyl oligopeptidase: a rising star on the stage of neuroinflammation research. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders). 2011 May 1;10(3):340-8

37. Jackson KW, Christiansen VJ, Yadav VR, Silasi-Mansat R, Lupu F, Awasthi V, Zhang RR, McKee PA. Suppression of tumor growth in mice by rationally designed pseudopeptide inhibitors of fibroblast activation protein and prolyl oligopeptidase. Neoplasia. 2015 Jan 1;17(1):43-54

38. Stojković MB, Mitić SS, Pavlović JL, Stojanović BT, Paunović DĐ. Antioxidant potential of Tanacetum vulgare L. extracts. Biologica nyssana. 2017 Oct 26;5(1).) Vancouver (Fraga CG, editor. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology. John Wiley & Sons; 2009 Oct 22.)

39. Fraga CG, editor. Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology. John Wiley & Sons; 2009 Oct 22

40. Paula-Freire, Lyvia IG. Comparison of the chemical composition and biological effects of the roots, branches and leaves of Heteropterys tomentosa. Journal of ethnopharmacology. 2013; 2:647-652

41. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. 2000; 48:3597-3604

42. Pandey KB, and Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2009; 5:270-278

43. Puengphian C, Sirichote A., [6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe) extracts from supercritical CO2 extraction, As. J. Food Ag-Ind. 2008; 1:29-36

44. Arituluk ZC, Çankaya II, Özkan AM. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Contents of Some Tanacetum L.(Asteraceae) Taxa Growing in Turkey/Türkiye'de Yetisen Bazi Tanacetum L.(Asteraceae) Taksonlarinin Antioksidan Aktivitesi, Total Fenolik ve Flavonoit Içerikleri. FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016;41(1):17

45. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Natural product reports. 2009;26(8):1001-43.), (Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. Phytochemistry Reviews. 2008 Jul 1;7(2):301.), (Karakaya S. Bioavailability of phenolic compounds. Critical reviews in food science and nutrition. 2004 Nov 1;44(6):453-64

46. Pereira DM. Valentao P, Pereira JA, Andrade PB. Phenolics: From Chemistry to Biology. Molecules. 2009; 14:2202-2211

47. Slavov I, Mihaylova D, Dimitrova- Dyulgerova I. Phenolic acids, flavonoid profile and antioxidant activity of Cardus

48. Xiao ZP, Peng ZY, Peng MJ, Yan WB, Ouyang YZ, Zhu HL. Flavonoids health benefits and their molecular echanism. Mini Rev Med Chem. 2011; 11:169-77

49. Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. Molecules. 2011; 16:251-280

50. Yokozawa T, Kim HY, Cho EJ, Choi JS, Chung HY. Antioxidant Effects of isorhamnetin 3,7-Di-O-β-d-glucopyranoside isolated from mustard leaf (Brassica juncea) in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. J. Agric. Food. Chem. 2002; 50:5490-5495

51. Jung M, Park M. Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from Agrimonia pilosa. Molecules. 2007 Sep 3;12(9):2130-9

52. Aa V, Geethab M, Va R. Anti-Psoriatic Activity of Flavonoids from the Bark of Givotia rottleriformis Griff. Ex Wight. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014;10(3):81-94

53. Ohtsuki T, Yokosawa E, Koyano T, Preeprame S, Kowithayakorn T, Sakai S, Toida T, Ishibashi M. Quinic acid esters from Pluchea indica with collagenase, MMP-2 and MMP-9 inhibitory activities. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2008 Feb;22(2):264-6

54. Zhang JX, Xing JG, Wang LL, Jiang HL, Guo SL, Liu R. Luteolin Inhibits Fibrillary β-Amyloid1–40-Induced Inflammation in a Human Blood-Brain Barrier Model by Suppressing the p38 MAPK-Mediated NF-κB Signaling Pathways. Molecules. 2017 Feb 24;22(3):334

55. López-Lázaro M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mini reviews in medicinal chemistry. 2009 Jan 1;9(1):31-59

56. Wang Y, Wang J, Gong X, Wen X, Gu X. Luteolin: Anti-breast Cancer Effects and Mechanisms. Journal of Exploratory Research in Pharmacology. 2018 Aug 31;3(3):85-90

57. Lin CH, Chang CY, Lee KR, Lin HJ, Chen TH, Wan L. Flavones inhibit breast cancer proliferation through the Akt/FOXO3a signaling pathway. BMC cancer. 2015 Dec;15(1):958.

58. Tahoori F, Ahmad MA, Nejadsattari T, Ofoghi H, Iranbakhsh A. Qualitative and Quantitative Study of Quercetin and Glycyrrhizin in In Vitro Culture of Liquorice (Glycyrrhiza glabra L.) and Elicitation with AgNO3. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2018 Oct 16;47(1):143-51

59. Zhao M, Ma J, Zhu HY, Zhang XH, Du ZY, Xu YJ, Yu XD. Apigenin inhibits proliferation and induces apoptosis in human multiple myeloma cells through targeting the trinity of CK2, Cdc37 and Hsp90. Molecular cancer. 2011 Dec;10(1):104

60. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American journal of clinical nutrition. 2004 May 1;79(5):727-47

61. Loizzo M R, Pugliese A, Bonesi M, Tenuta M C, Menichini F, Xiao J, Tundis R., Edible Flowers: A Rich Source of Phytochemicals with Antioxidant and Hypoglycemic Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2016 ;64:2467-2474

62. Podsedek A, Vallejo F, Tomas-Barberan FA. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. Lwt- Food Sci. Technol. 2007; 40:1-11

63. Huang HM, Johanning GL, O'Dell BL. Phenolic acid content of food plants and possible nutritional implications. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1986 Jan;34(1):48-51

64. Herrmann K, Nagel CW. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Critical reviews in food science & nutrition. 1989 Jan 1;28(4):315-47

65. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. Natural product reports. 2009;26(8):1001-43

66. Lafay S, Gil-Izquierdo A. Bioavailability of phenolic acids. Phytochemistry Reviews. 2008 Jul 1;7(2):301.), (Karakaya S. Bioavailability of phenolic compounds. Critical reviews in food science and nutrition. 2004 Nov 1;44(6):453-64

67. Lo Scalzo R, Genna A, Branca F, Chedin M, Chassaigne H. Anthocyanin composition of cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) and cabbage (B. oleracea L. var. capitata) and its stability in relation to thermal treatments. Food Chem. 2008; 107:136-144

68. Ayaz FA, Hayirlioglu-Ayaz S, Alpay-Karaoglu S, Gruz J, Valentova K, Ulrichova J, Strnad M. Phenolic acid contents of kale (Brassica oleraceae L. var. acephala DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. Food Chem. 2008; 107:19-257.

69. Braca A, Fico G, Morelli I, De Simone F, Tomè F, De Tommasi N. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different Aconitum species. J. Ethnopharmacol. 2003; 86:63-67

70. Robbins R, Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. J. Agric. Food Chem. 2003; 51:2866–2887

71. Spencer JP, El Mohsen MM, Minihane AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. British Journal of Nutrition. 2008 Jan;99(1):12-22

72. Gülçin İ. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). Toxicology. 2006 Jan 16;217(2-3):213-20

73. Weng CJ, Yen GC. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. Cancer treatment reviews. 2012 Feb 1;38(1):76-87

74. Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000 May 15;80(7):1033-43

75. Farah A. Coffee constituents. Coffee: Emerging health effects and disease prevention. 2012 Jan 24;1:22-58

76. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MS n identification of chlorogenic acids. Journal of agricultural and food chemistry. 2003 May 7;51(10):2900-11

77. Lin LZ, Harnly JM. Identification of hydroxycinnamoylquinic acids of arnica flowers and burdock roots using a standardized LC-DAD-ESI/MS profiling method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008 Oct 7;56(21):10105-14

78. Kremr D, Bajer T, Bajerová P, Surmová S, Ventura K. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: A review. Química Nova. 2016 May;39(4):530-3

79. Xue M, Shi H, Zhang J, Liu QQ, Guan J, Zhang JY, Ma Q. Stability and Degradation of Caffeoylquinic Acids under Different Storage Conditions Studied by High-Performance Liquid Chromatography with Photo Diode Array Detection and High-Performance Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. Molecules. 2016 Jul 21;21(7):948

80. Hemmerle H, Burger HJ, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler PW, Paulus E, Herling AW. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. Journal of medicinal chemistry. 1997 Jan 17;40(2):137-45

81. Wianowska D, Typek R, Dawidowicz AL. How to eliminate the formation of chlorogenic acids artefacts during plants analysis? Sea sand disruption method (SSDM) in the HPLC analysis of chlorogenic acids and their native derivatives in plants. Phytochemistry. 2015 Sep 1;117:489-99

82. Yang Z, Tan Z, Li F, Li X. An effective method for the extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (Boehmeria nivea L.) leaves using acidic ionic liquids. Industrial Crops and Products. 2016 Oct 30;89:78-86

83. Marković S, Tošović J. Comparative study of the antioxidative activities of caffeoylquinic and caffeic acids. Food chemistry. 2016 Nov 1;210:585-92

84. Xiang Z, Ning Z. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. LWT-Food Science and Technology. 2008 Sep 1;41(7):1189-203

85. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine. 1996 Jan 1;20(7):933-56

86. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, Pirruccello JP, Ripatti S, Chasman DI, Willer CJ, Johansen CT. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. Nature. 2010 Aug;466(7307):707

87. Thompson LU, Yoon JH, Jenkins DJ, Wolever TM, Jenkins AL. Relationship between polyphenol intake and blood glucose response of normal and diabetic individuals. The American journal of clinical nutrition. 1984 May 1;39(5):745-51

88. Nakatani N, Kayano SI, Kikuzaki H, Sumino K, Katagiri K, Mitani T. Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (Prunus d omestica L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000 Nov 20;48(11):5512-6

89. Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. Current opinion in cell biology. 1999 Apr 1;11(2):255-60

90. Kurata R, Adachi M, Yamakawa O, Yoshimoto M. Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from sweetpotato (Ipomoea batatas L.) leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007 Jan 10;55(1):185-90

91. Adolpho LO, Marin D, Puigpinos A, Mendieta L, Tarragó T, Morel AF, Giralt E, Dalcol II. In vitro evaluation of caffeoyl and cinnamoyl derivatives as potential prolyl oligopeptidase inhibitors. Planta medica. 2013 Nov;79(16):1531-5.

92. Rocha LD, Monteiro MC, Teodoro AJ. Anticancer properties of hydroxycinnamic acids-A Review. Cancer and clinical oncology. 2012 Oct 30;1(2):109

93. Puangpraphant S, Berhow MA, Vermillion K, Potts G, Gonzalez de Mejia E. Dicaffeoylquinic acids in Yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hilaire) inhibit NF-κB nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and-3 in human colon cancer cells. Molecular nutrition & food research. 2011 Oct;55(10):1509-22

94. Rosa LS, Silva NJ, Soares NC, Monteiro MC, Teodoro AJ. Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer—a review. J. Nutr. Food Sci. 2016;6(2)

95. Alvarez AL, Habtemariam S, Juan-Badaturuge M, Jackson C, Parra F (2011) In vitro anti HSV-1 and HSV-2 activity of Tanacetum vulgare extracts and isolated compounds: an approach to their mechanisms of action. Phytother Res 25(2):296–301

96. McDougall B, King PJ, Wu BW, Hostomsky Z, Reinecke MG, Robinson WE Jr. Dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids are selective inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase. Antimicrob Agents Chemother. 1998 Jan;42(1):140-6.; Zhu K, Cordeiro ML, Atienza J, Robinson WE Jr, Chow SA. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicaffeoylquinic acids. J Virol. 1999 Apr;73(4):3309-16

97. Vitcheva VB, Simeonova RL, Kondeva-Burdina MS, Zheleva-Dimitrova DZ, Balabanova VI, Yagi S, Gevrenova RS. In vivo evaluation of the antioxidant potential of dicaffeoylquinic acid isolated from Geigeria alata.

98. Todorova MN, Evstatieva LN. Comparative study of Tanacetum species growing in Bulgaria. Zeitschrift für Naturforschung C. 2001 Aug 1;56(7-8):506-12

99. Schmitz G. The phytophagous insect fauna of Tanacetum vulgare L.(Asteraceae) in Central Europe. Beiträge zur Entomologie= Contributions to Entomology. 1998 Mar 31;48(1):219-35

100. Lim, Tong Kwee. "Edible medicinal and non-medicinal plants." Vol. 1. Dordrecht: Springer, 2012: 656-687

101. Dragland S, Rohloff J, Mordal R, Iversen TH. Harvest regimen optimization and essential oil production in five tansy (Tanacetum vulgare L.) genotypes under a northern climate. Journal of agricultural and food chemistry. 2005 Jun 15;53(12):4946-53

102. Gören N, Arda N, Çaliskan Z. Chemical characterization and biological activities of the genus Tanacetum (Compositae). InStudies in Natural Products Chemistry 2002 Jan 1 (Vol. 27, pp. 547-658). Elsevier

103. Yakovlev AI, Sysoeva KN. Polysaccharide composition of a pectin complex from the inflorescences of Tanacetum vulgare. Chemistry of Natural Compounds. 1983 Jan 1;19(1):94-5

104. Xie G, Schepetkin IA, Quinn MT. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from Tanacetum vulgare L. International immunopharmacology. 2007 Dec 15;7(13):1639-50

105. Donald G, Barceloux MD. Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, toxic plants, and venomous animals, 2008, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey

106. Baranauskienė R, Kazernavičiūtė R, Pukalskienė M, Maždžierienė R, Venskutonis PR. Agrorefinery of Tanacetum vulgare L. into valuable products and evaluation of their antioxidant properties and phytochemical composition. Industrial Crops and Products. 2014 Sep 1;60:113-22

107. Petrov NM. Antiviral Activity of Plant Extract From Tanacetum Vulgare Against Cucumber Mosaic Virus And Potato Virus Y. Journal of BioScience and Biotechnology. 2016 Sep 19;5(2):189-94.

108. Devrnja N, Anđelković B, Aranđelović S, Radulović S, Soković M, Krstić-Milošević D, Ristić M, Ćalić D. Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of Tanacetum vulgare L. essential oil and methanol extracts. South African Journal of Botany. 2017 Jul 1;111:212-21

109. Mot CA, Lupitu AI, Bungau S, Iovan C, Copolovici DM, Purza L, Melinte CE, Copolovici L. Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Extracts Obtained from Herb of Tansy (Tanacetum Vulgare L.). Revista de chimie. 2018 May 1;69(5):1041-4

110. Garcia-Viguera C, Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain. J. Sci. Food Agric. 2002; 82:1293-1297). (Petrova I, Petkova N, Ivanov I. Five edible flowers –valuable source of antioxidants for human nutrition. IJPPR. 2016; 8:604-610

111. Bączek KB, Kosakowska O, Przybył JL, Pióro-Jabrucka E, Costa R, Mondello L, Gniewosz M, Synowiec A, Węglarz Z. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (Tanacetum balsamita L.) and tansy (Tanacetum vulgare L.). Industrial crops and products. 2017 Aug 1;102:154-63

112. MUREŞAN M, Benedec D, Vlase L, Oprean R, Toiu A, Oniga I. Screening of polyphenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of Tanacetum vulgare from Transylvania. Studia Universitatis Babes-Bolyai, Chemia. 2015 Mar 1;60(1):127-38

113. Uehara A, Akiyama S, Iwashina T. Foliar flavonoids from Tanacetum vulgare var. boreale and their geographical variation. Natural product communications. 2015 Mar;10(3):403-5.

114. Sheley RL, Hook PB, LeCain RR. Establishment of native and invasive plants along a rangeland riparian gradient. Ecological Restoration. 2006 Sep 1;24(3):173-81

115. Lim TK. Muscari neglectum. InEdible medicinal and non-medicinal plants 2014 (pp. 122-125). Springer, Dordrecht

116. Coté H, Boucher MA, Pichette A, Legault J. Anti-inflammatory, antioxidant, antibiotic, and cytotoxic activities of Tanacetum vulgare L. essential oil and its constituents. Medicines. 2017 May 25;4(2):34

117. Lim TK. Edible medicinal and non medicinal plants. Volume 11, Modified stems, roots, bulbs. Springer.; 2016

118. Holopainen M, Kaupinnen V. Antimicrobial activity of different chemotypes of Finnish tansy. Planta medica. 1989 Feb;55(01):102-

119. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002 Oct;97(7):1027-31

120. Coté H, Boucher MA, Pichette A, Legault J. Anti-inflammatory, antioxidant, antibiotic, and cytotoxic activities of Tanacetum vulgare L. essential oil and its constituents. Medicines. 2017 May 25;4(2):34

121. Onozato T, Nakamura CV, Cortez DA, Filho BP, Ueda-Nakamura T. Tanacetum vulgare: antiherpes virus activity of crude extract and the purified compound parthenolide. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2009 Jun;23(6):791-6

122. Williams CA, Harborne JB, Geiger H, Hoult JR. The flavonoids of Tanacetum parthenium and T. vulgare and their anti-inflammatory properties. Phytochemistry. 1999 Jun 1;51(3):417-23

123. Juan-Badaturuge M, Habtemariam S, Jackson C, Thomas MJ. Antioxidant principles of Tanacetum vulgare L. aerial parts. Natural Product Communications. 2009 Nov;4(11):1561-4

124. Özbilgin S, Akkol EK, Öz BE, Ilhan M, Saltan G, Acıkara ÖB, Tekin M, Keleş H, Süntar I. In vivo activity assessment of some Tanacetum species used as traditional wound healer along with identification of the phytochemical profile by a new validated HPLC method. Iranian journal of basic medical sciences. 2018 Feb;21(2):145

125. Kurkina AV, Khusainova AI, Daeva ED, Kadentsev VI. Flavonoids from Tanacetum vulgare flowers. Chemistry of Natural Compounds. 2011 May 1;47(2):284-5

126. IVĂNESCU B, TUCHILUŞ C, CORCIOVĂ A, Lungu C, Mihai CT, Gheldiu AM, Vlase L. ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF TANACETUM VULGARE, TANACETUM CORYMBOSUM AND TANACETUM MACROPHYLLUM EXTRACTS. FARMACIA. 2018 Mar 1;66(2):282-8

127. Wegiera M, Smolarz HD, Jedruch M, Korczak M, Koproń K. Cytotoxic effect of some medicinal plants from Asteraceae family on J-45.01 leukemic cell line--pilot study. Acta poloniae pharmaceutica. 2012;69(2):263-8.

128. Gospodinova Z, Antov G, Angelova S, Krasteva M. In vitro antitumor potential of Bulgarian Tanacetum vulgare L. on human breast adenocarcinoma cells. Inter J Pharma Sci. 2014;4:468-72

129. Liu Q, Jiang H. In vitro cytotoxicity of Tanacetum vulgare mediated silver nanoparticles against breast cancer (MCF-7) cell lines. Biomedical Research. 2017;28(3)

130. Georgieva G., Dobreva D, Panayotova V, & Merdzhanova A. Phenolic compounds in edible plants. In Варненски медицински форум (Varna Medical Forum). 2017, July, (Vol. 6, pp. 509-517

131. Merdzhanova A, Dobreva DA, Panayotova V. Assessment of proximate and bioactive lipid composition of Black Sea mussels (M. galloprovincialis) from Bulgaria. InBiological Resources of Water 2017 Dec 20. IntechOpen

132. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63

133. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS n. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005 May 18;53(10):3821-32

134. Zhang JY, Zhang Q, Li N, Wang ZJ, Lu JQ, Qiao YJ. Diagnostic fragment-ion-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids isomers in Flos Lonicerae Japonicae by HPLC-ESI-MSn. Talanta. 2013 Jan 30;104:1-9

135. Kajdžanoska M, Gjamovski V, Stefova M. HPLC-DAD-ESI-MSn identification of phenolic compounds in cultivated strawberries from Macedonia. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering. 2010 Dec 15;29(2):181-94

136. Kang J, Price WE, Ashton J, Tapsell LC, Johnson S. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. Food chemistry. 2016 Nov 15;211:215-26

137. Parejo I, Jauregui O, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from Tagetes maxima by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry. 2004 Dec 15;18(23):2801-10

138. Li S, Lin Z, Jiang H, Tong L, Wang H, Chen S. Rapid identification and assignation of the active ingredients in fufang banbianlian injection using HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS. Journal of chromatographic science. 2016 Apr 22;54(7):1225-37

139. Llorent-Martínez EJ, Zengin G, Fernández-de Córdova ML, Bender O, Atalay A, Ceylan R, Mollica A, Mocan A, Uysal S, Guler GO, Aktumsek A. Traditionally used Lathyrus species: phytochemical composition, antioxidant activity, enzyme inhibitory properties, cytotoxic effects, and in silico studies of L. czeczottianus and L. nissolia. Frontiers in pharmacology. 2017 Feb 27;8:83

140. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food chemistry. 2011 Jun 15;126(4):1821-35.

141. Dimitrova M, Iliev I, Tasheva D, Lozanov V, Ivanov I Novel Substrates for Determination of the Fibroblast Activation Protein-α Activity. Acta Morphol. Anthropol. 2017, 24(3-4), 3-9

142. López-Lázaro M. A simple and reliable approach for assessing anticancer activity in vitro. Current medicinal chemistry. 2015 Apr 1;22(11):1324-34.

143. Wang TY, Li Q, Bi KS. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. Asian journal of pharmaceutical sciences. 2018 Jan 1;13(1):12-23.

144. Yordi EG, Pérez EM, Matos MJ, Villares EU. Antioxidant and pro-oxidant effects of polyphenolic compounds and structure-activity relationship evidence. InNutrition, well-being and health 2012. InTech.

145. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia. 2011 Jun 1;82(4):513-23.

146. Z dos Santos M, I Dalcol I, Adolpho L, Teixidó M, Tarragó T, Morel A, Giralt E. Chemical composition and inhibitory effects of Hypericum brasiliense and H. connatum on prolyl oligopeptidase and acetylcholinesterase activities. Medicinal Chemistry. 2016 Aug 1;12(5):457-63.

147. Jia J, Martin TA, Ye L, Jiang WG. FAP-α (Fibroblast activation protein-α) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway. BMC cell biology. 2014 Dec;15(1):16

БЛАГОДАРНОСТИ:

Изразявам огромната си благодарност и признателност към всички, които допринесоха за реализирането на този дисертационен труд:

 На научните ми ръководители акад. проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн и доц. д-р Ивайло Иванов, дх, както и на доц. д-р Валентин Лозанов, дх, за гласуваното доверие и предоставените възможности, за оказаната подкрепа и напътствия

 На проф. Машенка Димитрова, д.б. и доц. д-р Иван Илиев, д.б. – Институт по експериментална морфология, патология и антропология с музей при БАН – София, за оказаното съдействие и професионализъм

 На всички колеги от Катедра „Медицинска химия и биохимия“ и най-вече от „Лаборатория по анализ и синтез на биологично активни вещества“ към Медицински университет – София за неоценимата помощ и съвети в процеса на работа

 На близките и приятелите ми, които вярват в мен и ме подкрепят в трудните моменти и в успехите

 На семейството и родителите ми за безграничната обич и подкрепа, за безкрайното търпение и вдъхновение, които ми дават стимул да вървя напред