



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**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователната и научна степен

„ДОКТОР“

Научна специалност: Биохимия

Научни ръководители:

Акад. проф. д-р Ваньо Митев, дм, дбн

Доц. д-р Ивайло Иванов, дх

Рецензенти:

проф. д-р инж. Митко Георгиев

доц. Ренета Славова Гевренова, дф.

София, 2019 г.

Дисертационният труд е написан на 76 страници и включва 31 фигури и 1 таблица. Библиографският списък съдържа 147 литературни източника, от които 145 на латиница и 2 на кирилица.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедрен съвет на Катедрата по медицинска химия и биохимия при Медицински факултет на Медицински университет, София проведен на 30.01.2019 г. (Протокол №366/30.01.2019).

*Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на **14.05.2019.** от **13 часа** в **1 аудитория, 2 етаж** на Медико-биологичния комплекс (МБК; бивш ПУЦ) на Медицински факултет, Медицински университет, София, ул. „Здраве“ 2, съгласно Заповед на ректора № РК36-482/28.03.2019г. пред научно жури в състав:*

Председател:

1. **Акад. проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн** – вътрешен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София, научен ръководител на докторанта.

Членове:

2. **Доц. Ренета Славова Гевренова, дф** - вътрешен член за МУ - София, Катедра „Фармакогнозия“ на Фармацевтичен факултет при МУ -София
3. **Акад. проф. Иван Георгиев Иванов, дбн** – външен член за МУ-София, Институт по молекулярна биология „Акад. Румен Цанев“ – Българска академия на науките.
4. **Проф. инж. Митко Петров Георгиев, дх** - външен член за МУ София, Химикотехнологичен и металургичен университет - гр. София
5. **Проф. Емилия Димитрова Найденова, дб** - външен член за МУ София, Химикотехнологичен и металургичен университет - гр. София.

Резервни членове:

1. **Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб** – вътрешен резервен член за МУ-София, Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София.
2. **Проф. Соня Върбанова Илиева, дхн** - външен резервен член за МУ - София, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по медицинска химия и биохимия (стая 304, МБК, ул. „Здраве“ 2, София) и са публикувани на интернет страницата на МУ-София.

**В автореферата номерата на фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд. Номерата на литературните източници в автореферата съответстват на номерата в дисертационния труд.*

Съдържание

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	4
1. ВЪВЕДЕНИЕ.....	5
3.ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ	6
3.1 Цели	6
3.2 Задачи	6
4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
4.1. Материали	7
4.2. Методи.....	8
5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	12
5.1. Екстракти и фракции от вратига	12
5.2. Определяне на химичния състав на екстрактите и фракциите от вратига.....	13
5.3 Антитуморна активност.....	24
5.4 Инхибиране на постпролин-специфична ензимна активност	28
6. ИЗВОДИ.....	35
7. ПРИНОСИ.....	36
8. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД..	37
8.1 Научни публикации по темата на дисертацията:	37
8.2 Участия в научни форуми във връзка с темата на дисертацията:.....	37
8.3 Участия в проекти във връзка с дисертационния труд:	38
9. БИБЛИОГРАФИЯ.....	39

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

T. vulgare	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-) трикафеоилхинови 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)
EASE	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
IC₅₀	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)
MMP	Матрични металопротеинази
LC-MS	Високоэффективна 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-високоэффективна 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).

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, свързани с експресията 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 *Tanacetum 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, Na₂SO₄, HCl, NaCl са от Sigma-Aldrich. EDTA е от AppliChem, а фосфатния буфер (NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄) 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 *Tanacetum vulgare L.* 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 недробенклетъчен 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 *Tanacetum 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 филтуват, промиват се с наситен разтвор на NaCl и се сушат с Na₂SO₄. 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 цветовете на вратига (EAFT)

Към 4 g цветовете 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 Na₂SO₄. 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* 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 Clariscer C₁₈ (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% В за 2 min, 23% В за 50 min, 90% В за 3 min, задържаеме 90% В за 4 min и 0% В за 3 min. Обемът на инжектиране на пробата е 10 mL.

4.2.2. Клетъчно култивиране

Туморните клетки бяха култивирани рутинно като монослое в 75 cm² 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 В) на 37°C при 5% CO₂ 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 10³ в 100 µL в 96-ямкови плоскодъбни 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 скрепър 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 МТТ-анализ

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

МТТ 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 IC₅₀.

Количеството на отделения формаза 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 IC₅₀ - концентрацията, необходима за 50% потискане на клетъчния растеж спрямо нетретираната контрола. За изчисляването на IC₅₀ беше прилаган

нелинеен регресионен анализ (GraphPad Prizm4 Software). Беше установена добра възпроизводимост на резултатите ($SD < \pm 10\%$). Статистически значимите разлики в преживяемостта/пролиферацията между нетретирани контроли и третирани 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 М фосфатен буфер (pH 7.4), съдържащ 0.1 М NaCl, 1 mM EDTA и 80 μ M 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 М фосфатен буфер (pH 7.4), съдържащ 0.1 М NaCl, 1 mM EDTA и 80 μ M флуорогенен субстрат Z-Gly-Pro-AMC при 37 °C в присъствие на различни концентрации (5, 10, 15, 20, 25, 37.5 и 50 μ g/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 М фосфатен буфер (pH 7.4), съдържащ 0.1 М NaCl, 1 mM EDTA и при 37 °C. Бяха използвани различни концентрации от флуорогенния субстрат Z-Gly-Pro-AMC (20, 30, 40 и 50 μ M) в отсъствие и присъствие на различни концентрации (50 и 75 μ g/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% В за 1 min, 30-90% В за 30 min, 90% В за 5 min, 90 - 0% В за 2 min и 0% В 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 въртешно разпръскване 32 относителни единици (ОЕ), дебит на допълнителния газ 10 ОЕ, дебит на резервния газ 3 ОЕ, температура на капиляра 320 °C, температура на нагряемия 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).

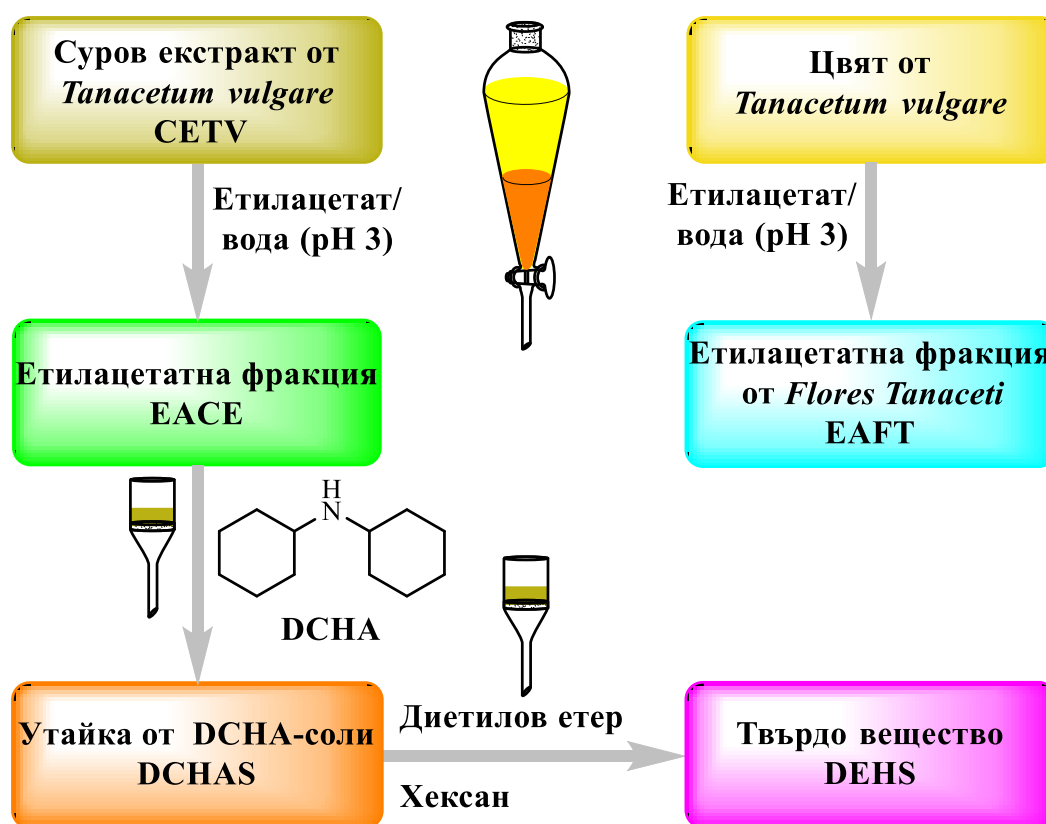
5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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 рН 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]. Етилацетатът 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 1 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 рН на водната фаза се довежда до 3, след което се добавя етилацетат. При това рН, 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 апотни 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 рН на водната фаза бе доведено до 3. Водата предизвиква подуване на растителните частици и увеличава поръзността 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. 1 Схема на получаване на екстракти и фракции от *Tanacetum 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

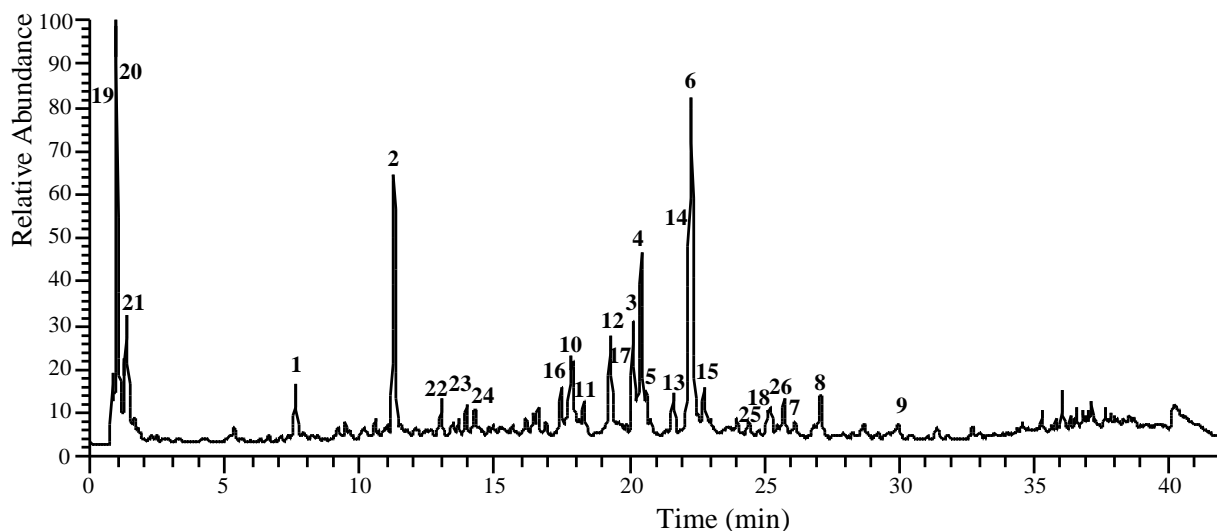
йонизация. Идентифицирането на съединенията е извършено чрез MS² анализи, които са сравнени с литературни данни. Получените от нас резултати са обобщени в таблица 1. Общата йонна хроматограма (TIC) на суровия екстракт е представена на фигура 2.

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

Пик №	[M-H] ⁻ m/z δ (ppm)	Молекулна формула	MS ² данни m/z, (R.I., %)	Идентифицирано 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]

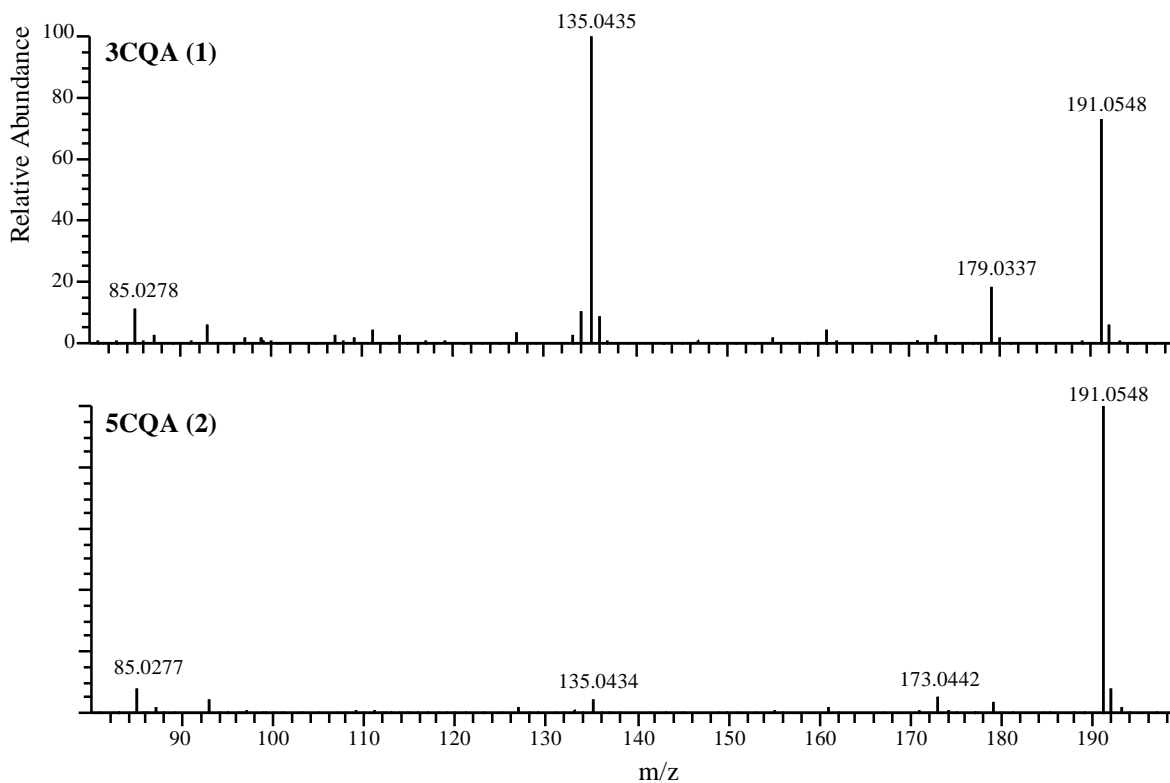
14	477.1028 (0.06)	$C_{22}H_{22}O_{12}$	301.0710 (100), 286.0477 (25), 242.0575 (15), 199.0547 (10), 151.0020 (22)	Хомоериодиктиол- О-глюкуронид [136]
15	475.0876 (1.08)	$C_{22}H_{20}O_{12}$	300.0588 (12), 299.0556 (68), 284.0322 (100), 175.0235 (17), 113.0227 (45)	Крисоериол-7-О- глюкуронид [113]
Флавоноиди 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 MS² спектрите с литературните данни.

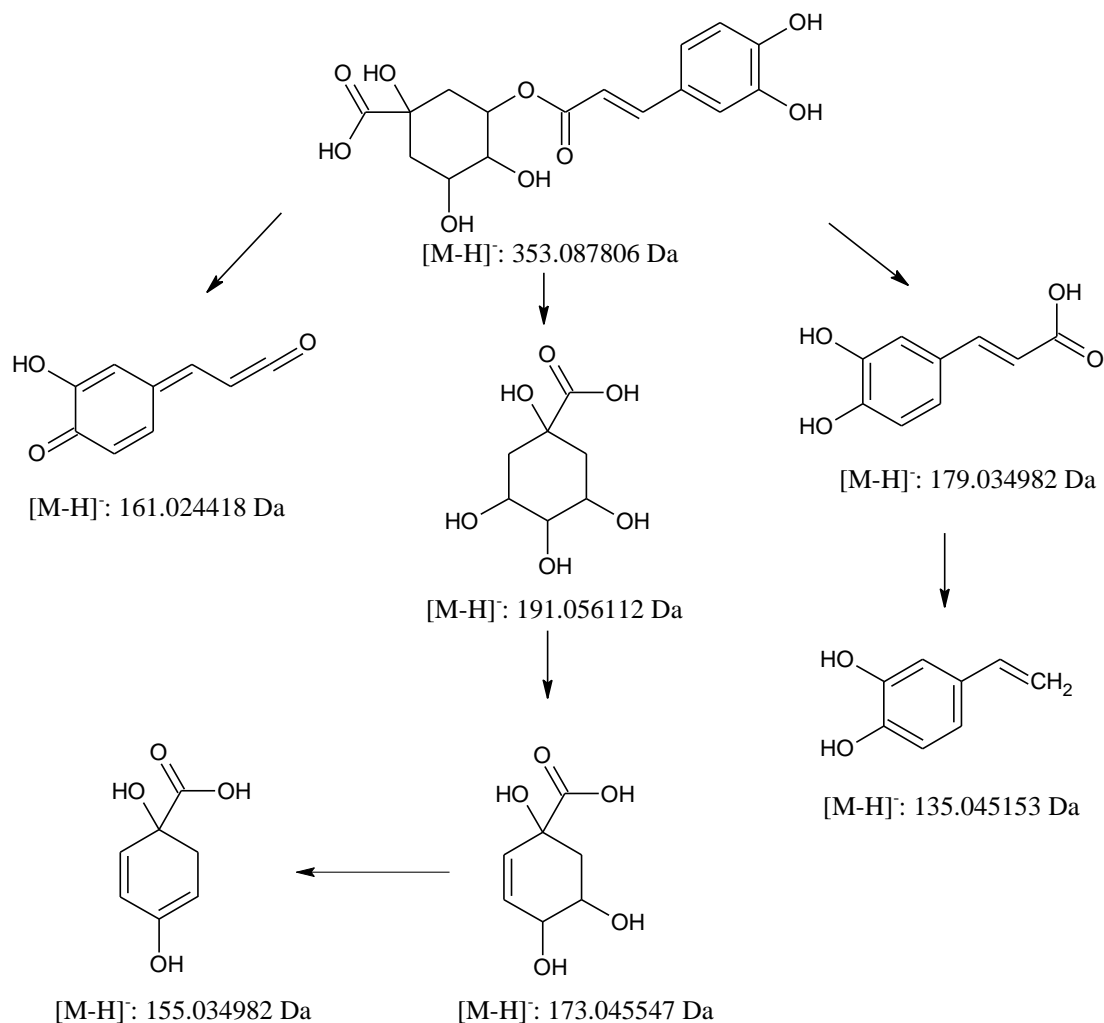


Фиг. 2. Обща йонна хроматограма (TIC) на суров екстракт от *Tanacetum vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация. Номерирането на съединенията съответства на Таблица 1.

Съединенията **1** и **2** показват $[M-H]^-$ йон с m/z 353.08 в отрицателен режим, който съответства на два изомера на кафеилхиновата киселина (CQA). MS^2 спектрите на тези вещества са представени на фигура 3.

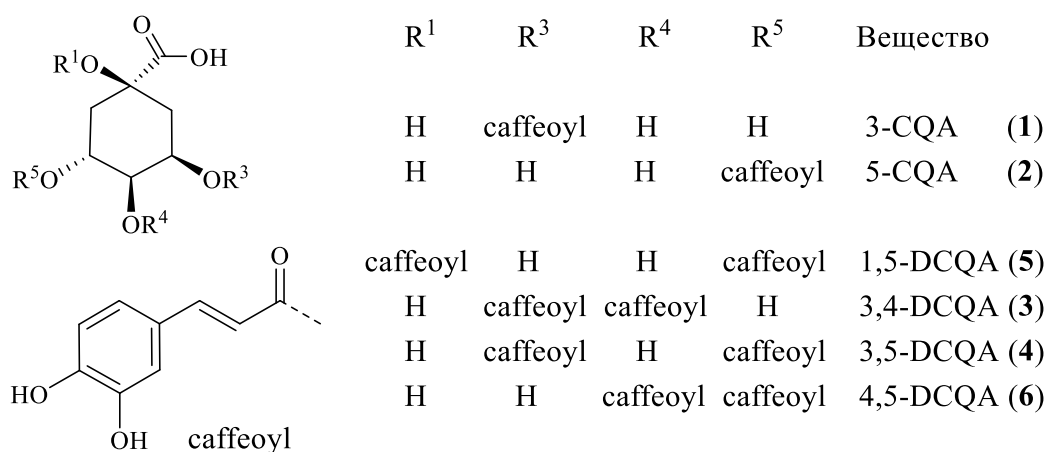


Фигура 3. MS^2 спектрите на съединения **1** и **2**.



Фигура 4. Пътища на фрагментиране на CQAs и структура на получените йони.

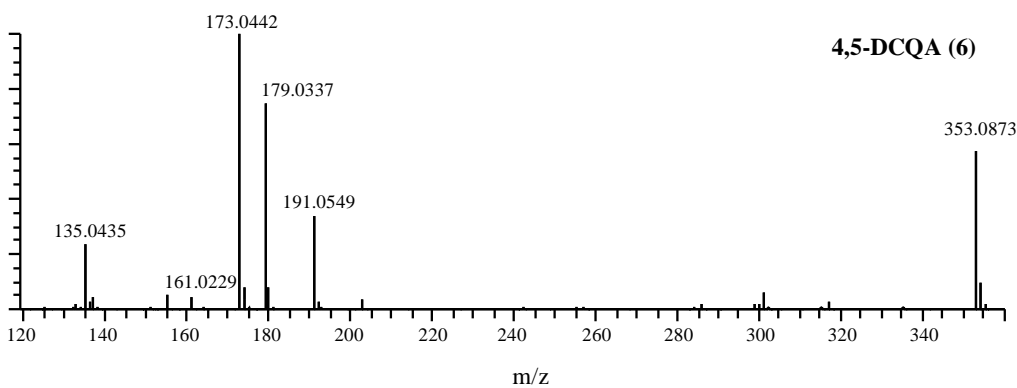
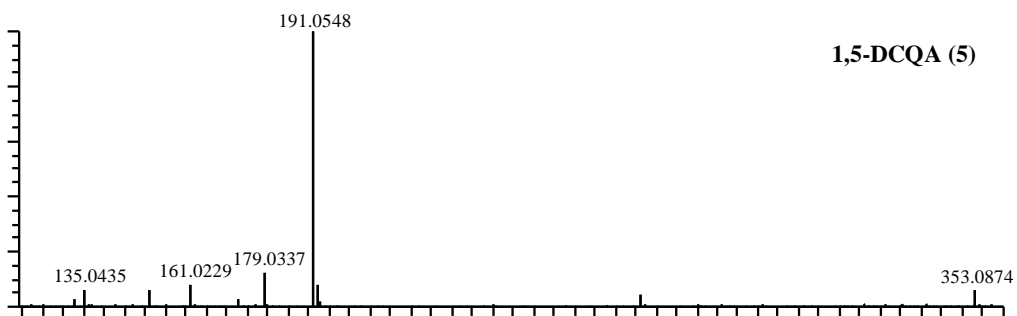
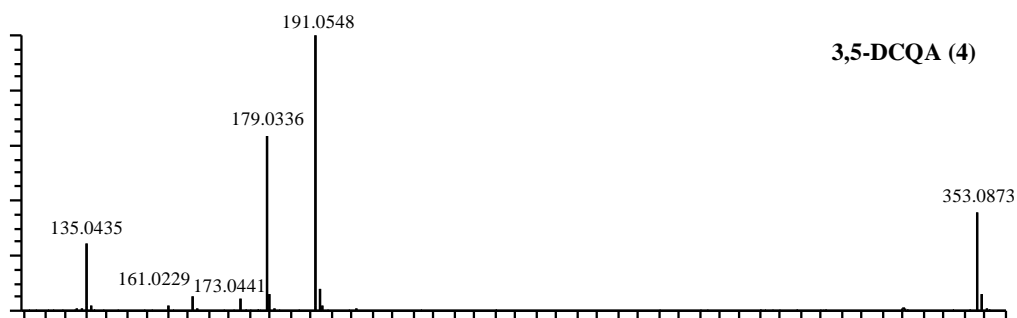
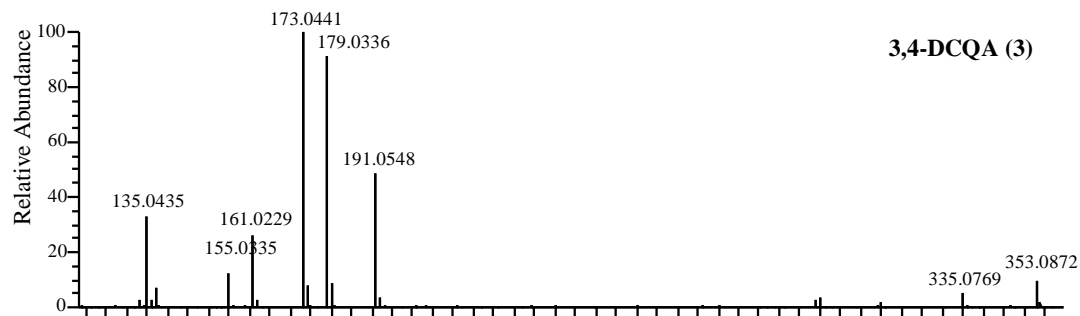
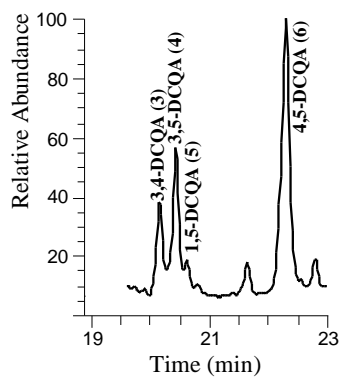
Първичните пътища на разграждане на изомерните CQAs генерират фрагментни йони (Фиг. 4), такива като m/z 191, съответстващ на [хинова киселина-H]⁻, m/z 179, съответстващ на [кафеена киселина-H]⁻, m/z 173, съответстващ на [хинова киселина-H-H₂O]⁻ и m/z 135, съответстващ на [кафеената киселина-CO₂]⁻. Структурите 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 MS² 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 5.



Фигура 5. Структура на откритите в суровия екстракт хлорогенни киселини.

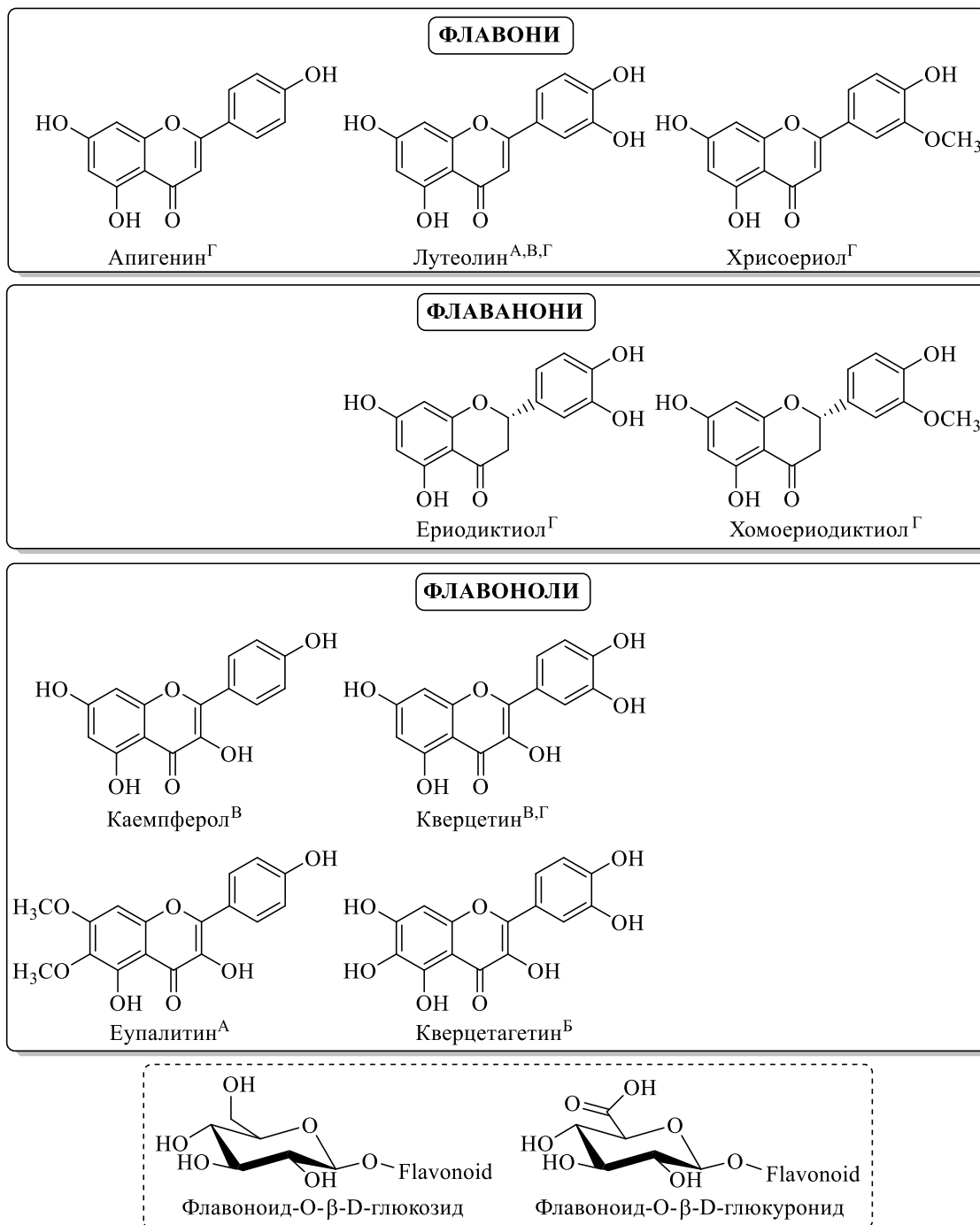
Съединенията **3-6** дават $[M-H]^-$ йони с m/z 515.12 което показва, че те са изомери на дикафеоилхиновата киселина (DCQA). Техните диагностични йони са същите като на CQA, но в техните MS^2 спектри има и характерен йон с m/z 353.08, съответстващ на $[CQA-H]^-$. Структурата на дикафеоилхиновите киселини са представени на фигура 5, а техните MS^2 спектри са показани на фигура 6.

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.



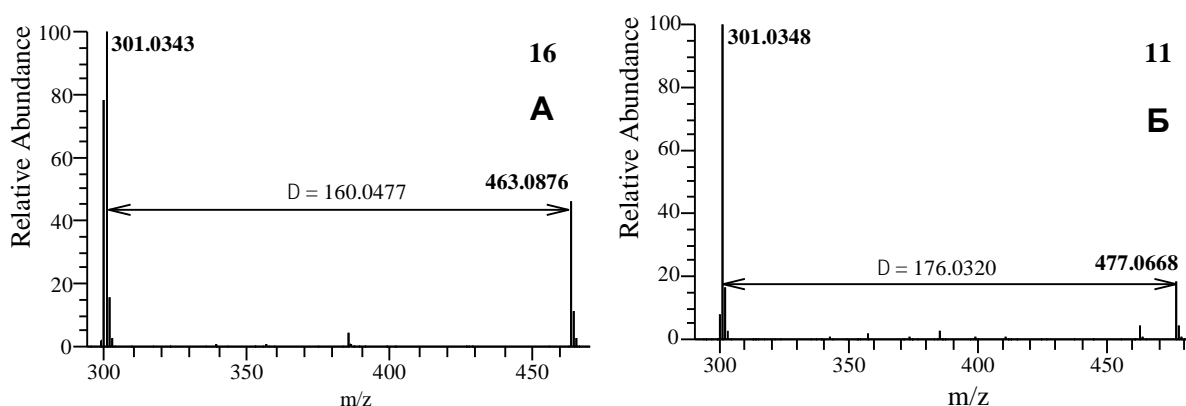
Фигура 6. MS² спектрите на съединенията 3 - 6.

Общо дванадесет флавоноида и техните производни бяха открити в суровия екстракт от *Tanacetum vulgare L.* Идентифицирането на агликоновата част във флавоноид-О-глюкозидите и на флавоноид-О-глюкуронидите е направено чрез анализи на спектъра MS² и сравнение със съответните спектри в литературни източници (Таблица 1). Структурите на флавоноидите и флавоноидните агликони идентифицирани в екстракта са представени на фигура 7.



Фигура 7. Химичните структури на флавоноидите и флавоноидните агликони идентифицирани в суровия екстракт от *Tanacetum 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 регистрирани в екстракта. Това са кверцетин-3-О-глюкозид, лутеолин-7-О-глюкозид (**16**) и каемпферол-О-(кафеил)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 8-А е представен MS² 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 8. MS² спектрите на А) кверцетин-3-О-глюкозид; Б) кверцетин-3-О-глюкуронид.

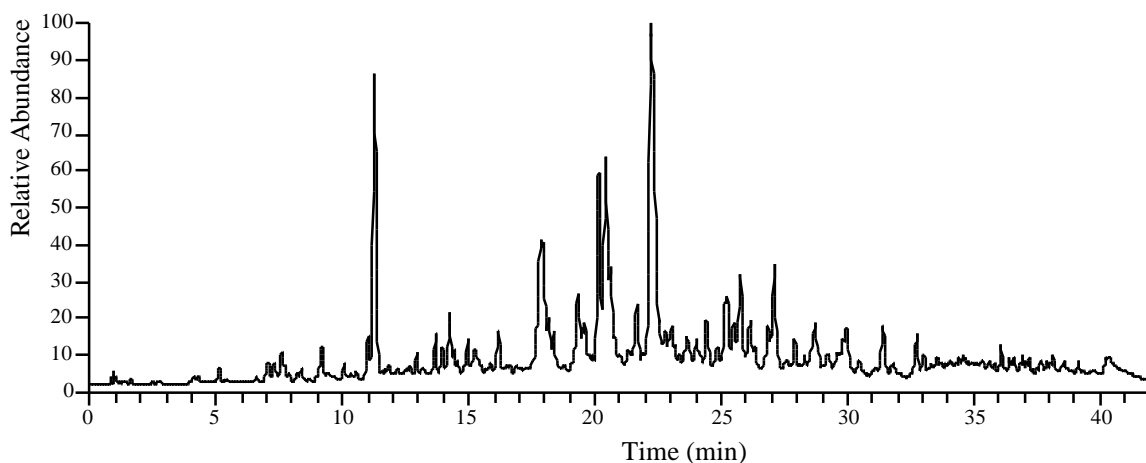
В екстракта идентифицирахме шест флавоноид-О-глюкурониди (съединения **10-15**). Това са ериодиктиол-О-глюкуронид (**10**), кверцетин-3-О-глюкуронид (**11**), лутеолин-7-О-глюкуронид (**12**), апигенин-7-О-глюкуронид (**13**), хомоериодиктиол-О-глюкуронид (**14**) и хрисоериол-7-О-глюкуронид (**15**). Характерно за глюкуронидите е загубата на маса от 176 Da при фрагментирането на молекулния йон. Илюстрация за това е MS² спектъра на кверцетин-3-О-глюкуронид (**11**), представен на фигура 8-Б. Като цяло, главните флавоноидни аглиconi 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 *Tanacetum 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)

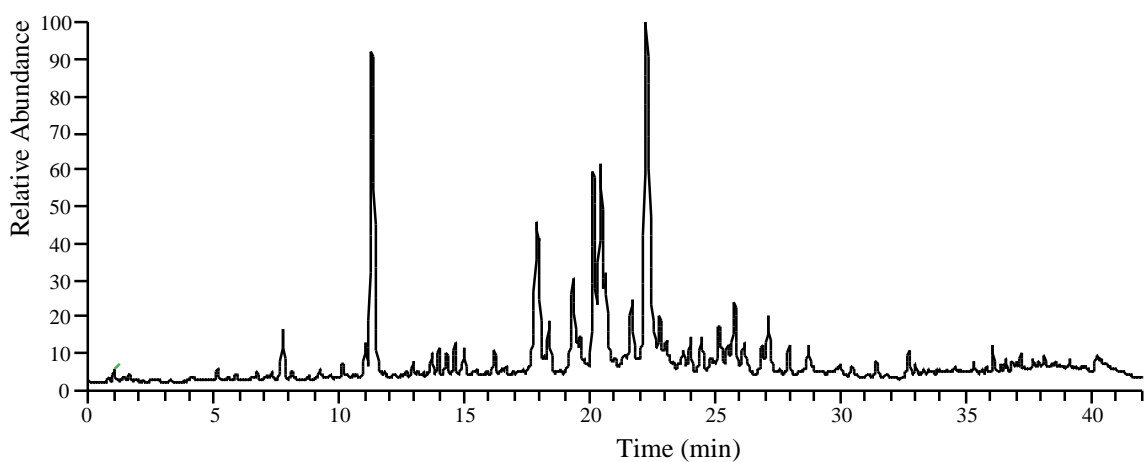
Анализът на етилацетатната фракция чрез LC-HRMS (Фиг. 9) показва, че в органичната фаза са екстрахирани относително хидрофобните компоненти. Хидрофилни

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 9. Обща йонна хроматограма (TIC) на етилацетатната фракция (EACE) от суровия екстракт на *Tanacetum vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

5.1.3 Характеризиране на дициклохексиламониеви соли (DCHAS)



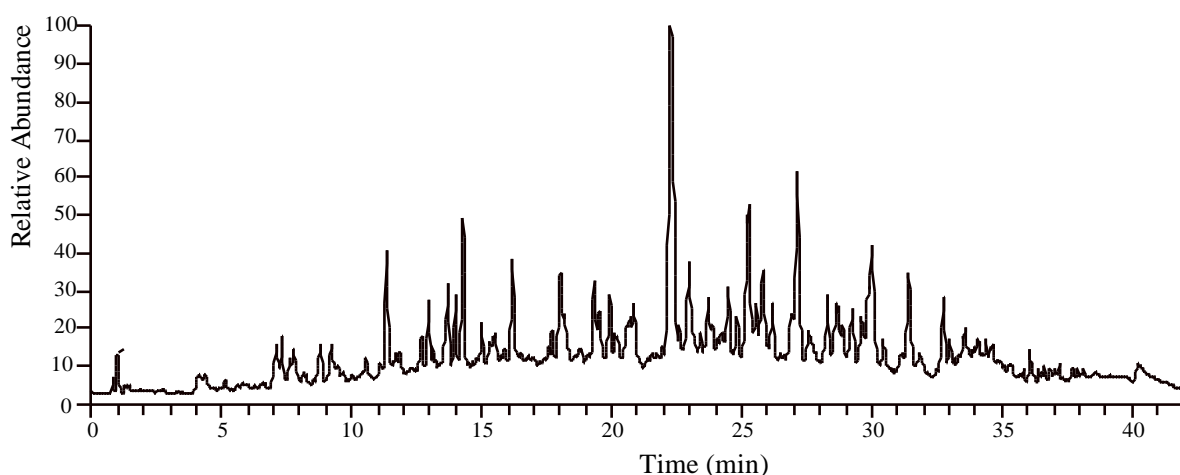
Фигура 10. Обща йонна хроматограма (TIC) на фракцията от дициклохексиламониеви соли (DCHAS) от суровия екстракт на *Tanacetum vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

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. 10) 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.

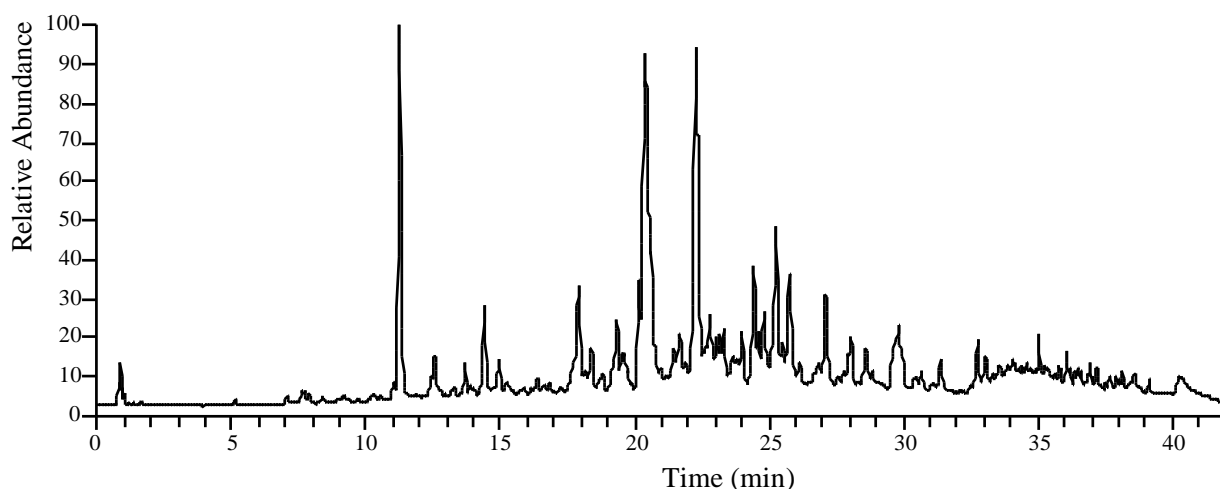
5.1.4 Характеризиране на твърдото вещество от диетилов етер/хексан (DEHS)

Полученото тъмножълто твърдо вещество от филтратата след утаяване с диетилов етер/хексан показва (Фиг. 11) наличието на кверцетагетин диметилов етер, еупалитин, неизвестно съединение с m/z 457.21, остатъчно количество от 5-СQA, лутеолин, хомоериодиктиол-О-глюкуронид и други неидентифицирани съединения.



Фигура 11. Обща йонна хроматограма (TIC) на твърдото вещество от диетилов етер/хексан (DEHS) от суровия екстракт на *Tanacetum vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

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

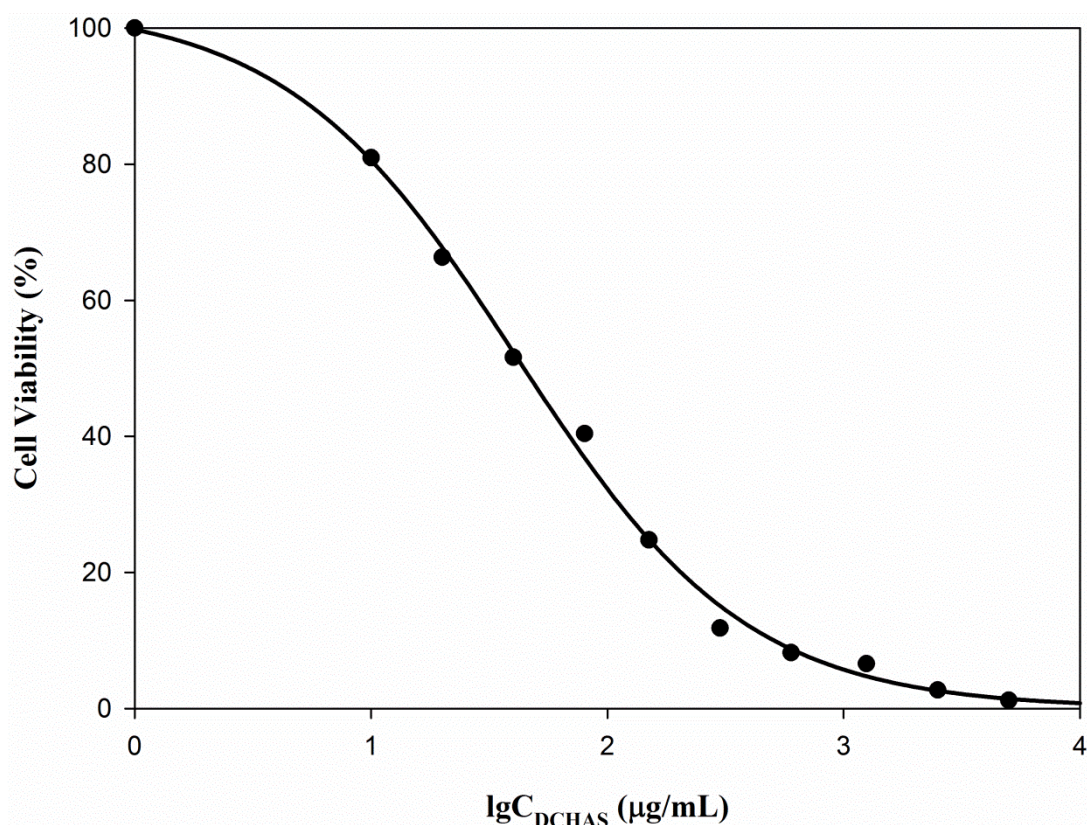


Фигура 12. Обща йонна хроматограма (TIC) на етилацетатната фракция (EAFT) от цвета на *Tanacetum vulgare L.* в режим на отрицателна йонизация.

Чрез LC-HRMS (Фиг. 12) 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

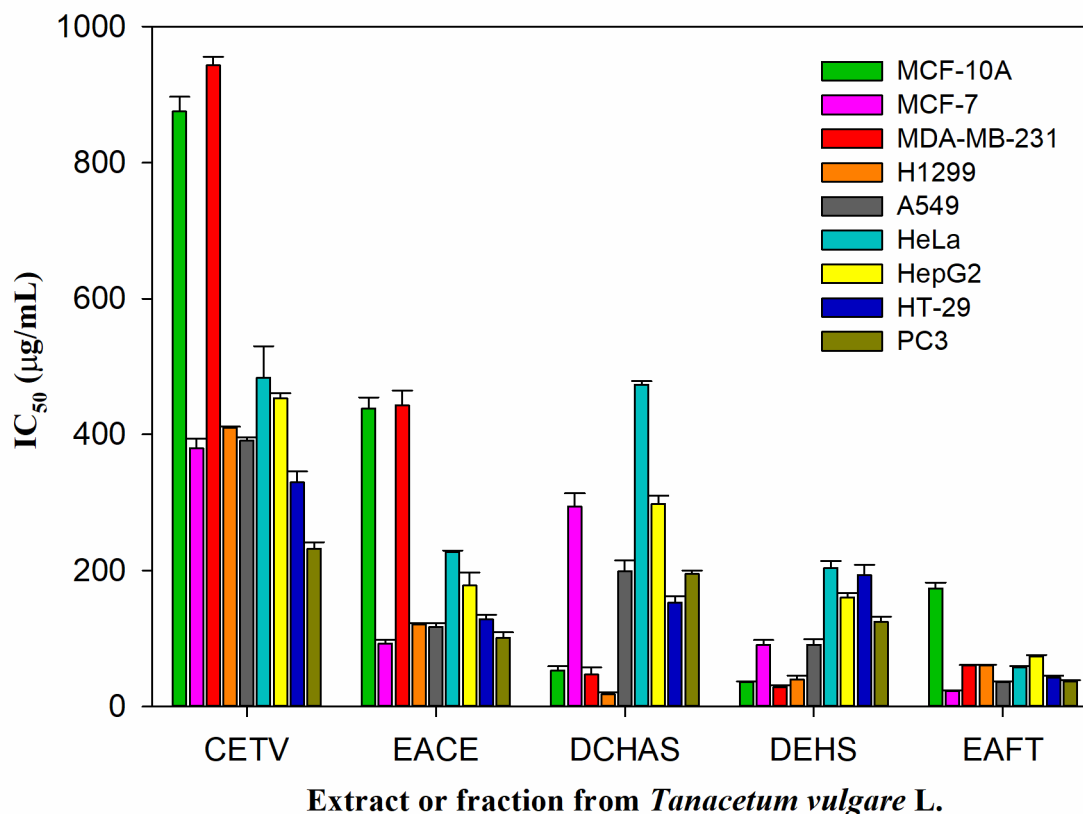
Екстрактите и фракциите от вратига са тествани в *in vitro* условия върху 9 човешки клетъчни линии - една нормална и осем туморни. Противотуморната активност се проследява след 72 часа инкубация със съответните субстанции при концентрации от 10 до 5000 $\mu\text{g/mL}$ (два пъти нарастващи разреждания).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



Фигура 13. 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. 14.

Както се вижда от фигура 14 най-ниска токсичност към нетуморогенната клетъчна линия проявява суровият екстракт CETV ($IC_{50} = 875 \pm 21.9 \mu\text{g/mL}$). Етилацетатният екстракт EACE показва умерена токсичност ($IC_{50} = 438 \pm 16.8 \mu\text{g/mL}$), а екстарктът EAFT проявява 2.5 пъти по-висок цитотоксичен ефект ($IC_{50} = 174.1 \pm 8.4 \mu\text{g/mL}$). Фракциите DCHAS и DEHS проявяват значително по-висока токсичност в сравнение с останалите субстанции: $53 \pm 6,4$ и $36 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$, съответно.



Фигура 14. IC_{50} стойности, получени чрез МТТ анализ, за екстракти и фракции от *Tanacetum 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 \pm SD. CETV - суров екстракт от *Tanacetum 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 $\mu\text{g/mL}$), а най-високо токсичен - етилацетатният екстракт от цветовете на вратига (IC_{50} от 22.8 до 73.5 $\mu\text{g/mL}$). 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 ($IC_{50} 473.6 \pm 5.10 \mu\text{g/mL}$), а най-висок - върху H1299 ($IC_{50} 18 \pm 3.4 \mu\text{g/mL}$). Фракцията DEHS е силно токсична за клетките от линията MDA-MB-231 ($IC_{50} 29.0 \pm 2.1 \mu\text{g/mL}$) и по-слабо за клетките от линията H1299 ($IC_{50} 40.0 \pm 5.2 \mu\text{g/mL}$). Най-слабо чувствителната клетъчна

линия към тази субстанция е HeLa ($IC_{50} 203.7 \pm 10.4 \mu\text{g/mL}$). Етилацетатният екстракт (EAFT) проявява изразена цитотоксичност спрямо всички туморни клетъчни линии – IC_{50} от $22.8 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$ за MCF-7 до $73.5 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$ за HepG2. Най-чувствителната клетъчна линия спрямо изследваните субстанции е H1299.

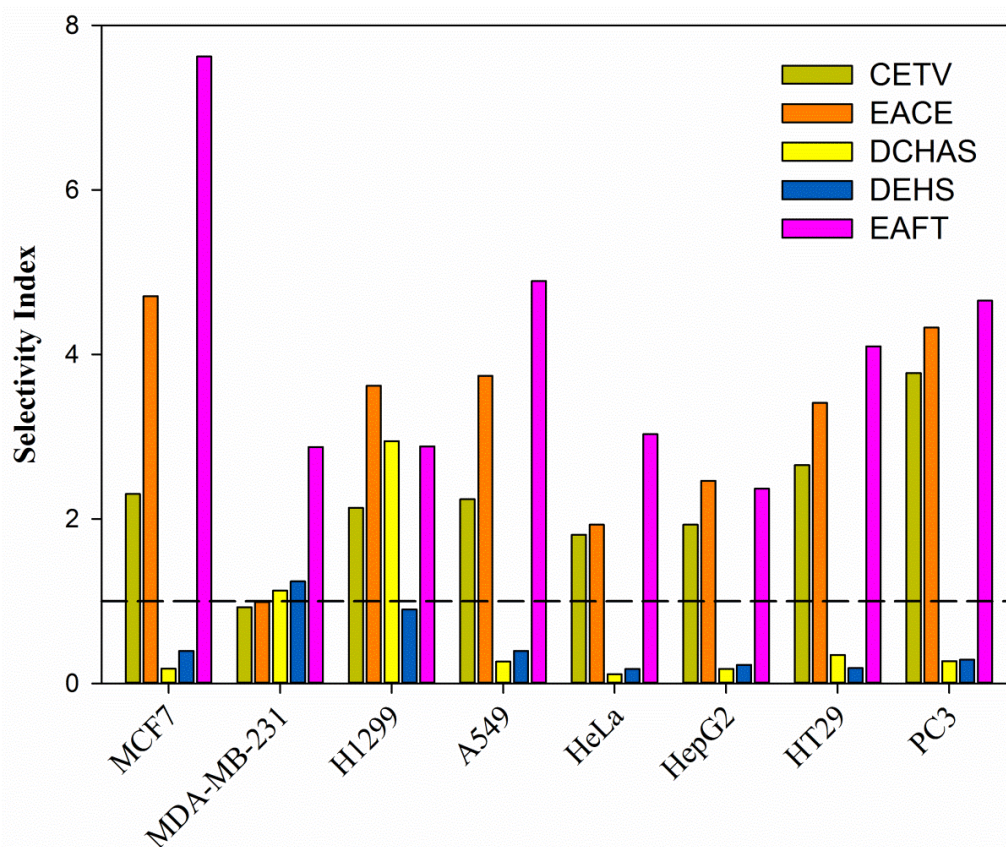
Изследванията на цитотоксичния ефект на тотален водно-етанолов екстракт от надземни части на *Tanacetum vulgare L.* спрямо клетъчна линия MCF-7, са показали концентрационна зависимост на цитотоксичното му действие върху преживяемостта на туморните клетки, като IC_{50} е $286.8 \mu\text{g/ml}$ [128]. Според друго проучване на същата група автори [2], висока антитуморна активност спрямо клетъчна линия MCF-7 ($IC_{50} = 28.0 \mu\text{g/mL}$) и HeLa ($IC_{50} = 47.7 \mu\text{g/mL}$), проявява хлороформната фракция от цветовете на *Tanacetum vulgare L.* Съгласно нашите резултати IC_{50} на суровия екстракт спрямо клетъчната линия MCF-7 е $380 \pm 13.6 \mu\text{g/mL}$, а за етилацетатната фракция от цветовете на билката IC_{50} е $93 \pm 5.7 \mu\text{g/mL}$, а спрямо клетъчната линия HeLa IC_{50} е $227.1 \pm 2.2 \mu\text{g/mL}$. 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, етилацетатният екстракт от цветовете на вратига EAFT има по-висок цитотоксичен ефект, $IC_{50} = 22.8 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$ спрямо MCF-7 и съответно $57.5 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$ 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 вещество (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 фракцията 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 ѝ 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 клетки 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 15. 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 получените 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 EASE 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 екстрактите от *Tanacetum 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 EASE, 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.

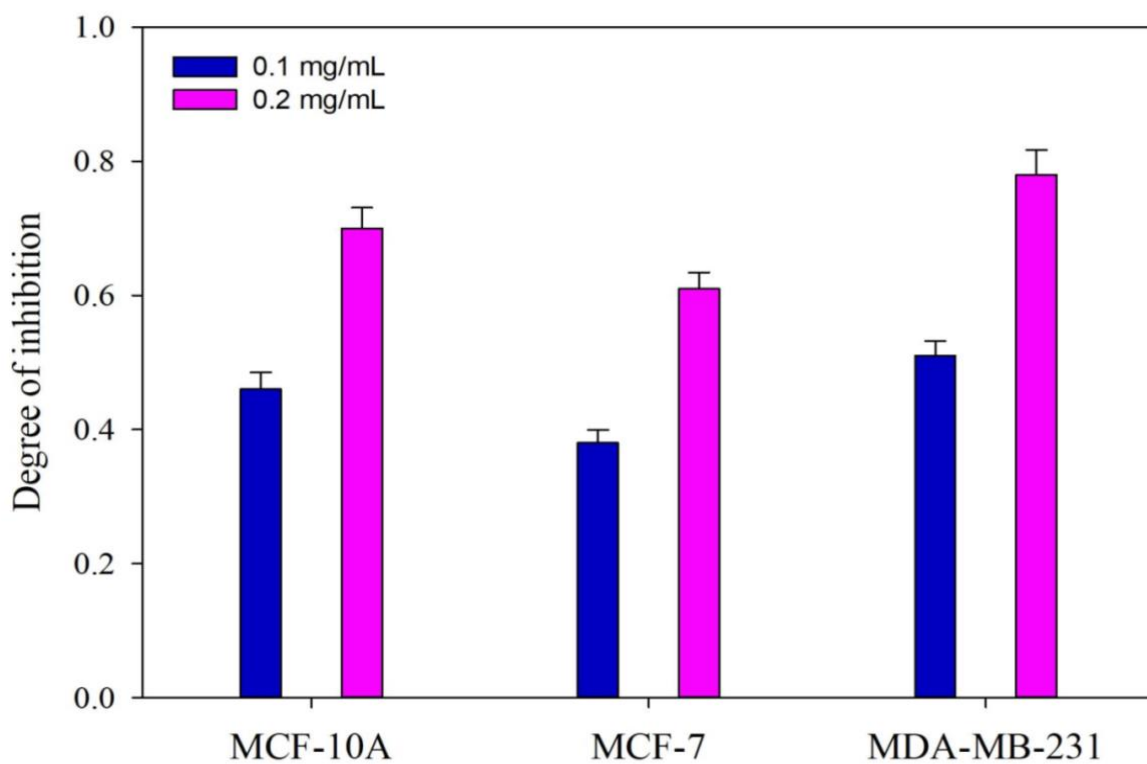
Един важен подход към решаване на редица медицински проблеми е намирането на ефективни лекарства на основата на природни вещества. В частност това се отнася за намирането на селективни инхибитори за DPP-IV, FAP и POP. Установено е например, че някои флавоноиди и кафеоилхинови киселини (хидроксицинамоилхинови 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 *Tanacetum 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 концентрационно 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 *Tanacetum 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.

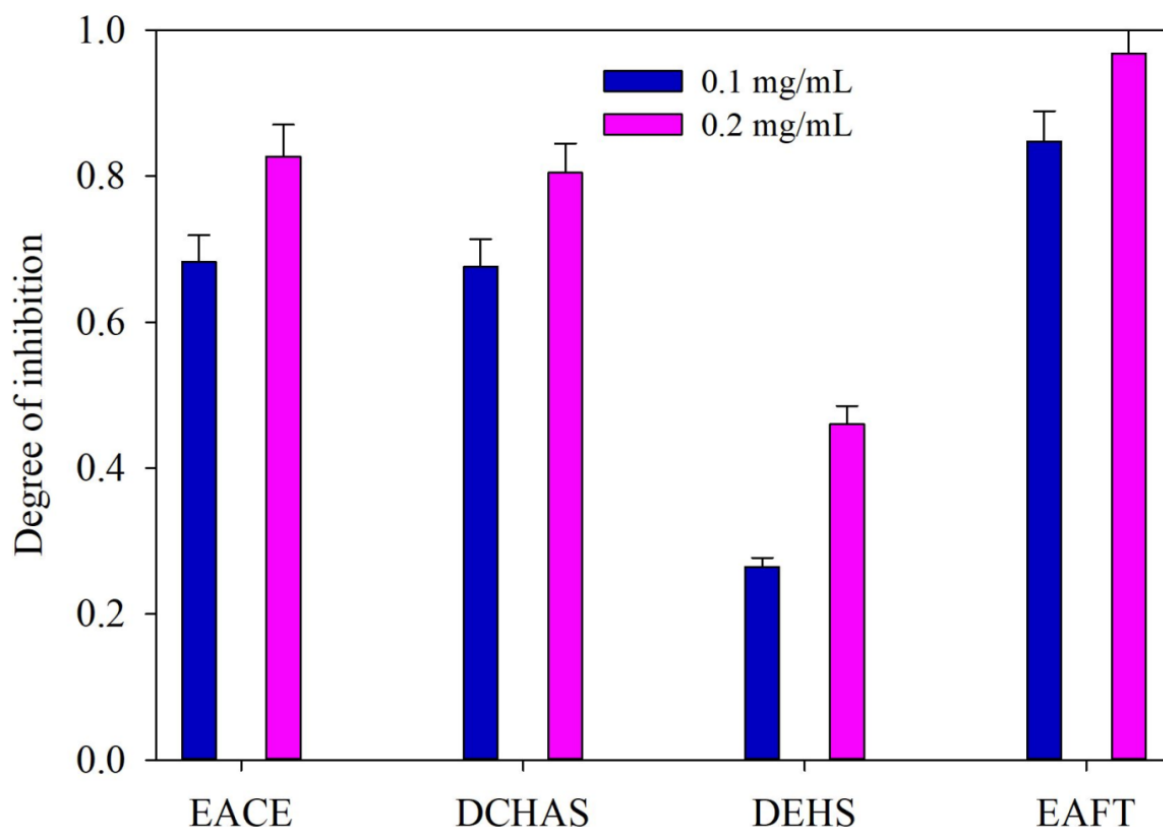
Клетъчната линия MDA-MB-231 (троен негативен човешки карцином на млечната жлеза) обикновено се използва като отрицателна контрола за FAP, тъй като е известно, че липсва такава ензимна активност [147, 141]. Проучихме ефекта на суровият екстракт от билката върху ензимната активност спрямо рекомбинантна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

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. 17) в сравнение със тази на суровия екстракт (Фиг. 16). 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.).



Фигура 16. Степен на инхибиране на постпролин-специфичната ензимна активност от суровия екстракт от *Tanacetum vulgare* L. в хомогенати от три човешки клетъчни линии.

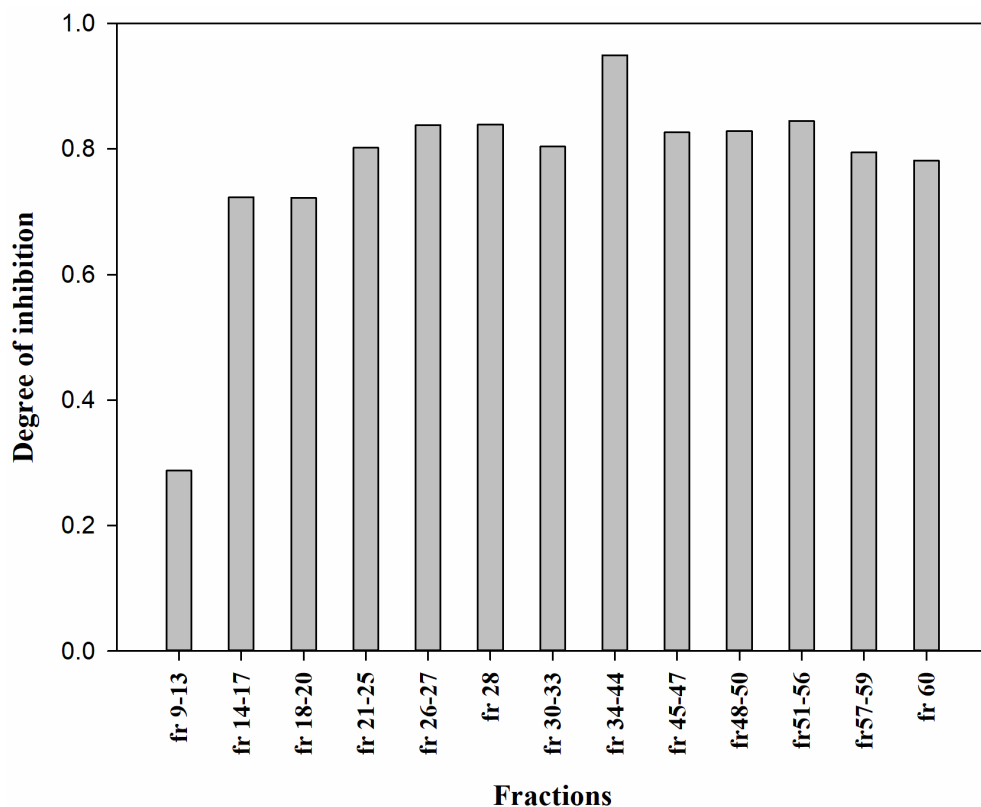


Фигура 17. Инхибиращ ефект на отделните фракции върху постпролин-специфичната ензимна активност в хомогената от MDA-MB-231 клетъчната линия. EACE - етилацетатна фракция от суровия екстракт от вратига; DCHAS - фракция от дициклохексиламониеви соли; DEHS – утайка получена в смес от диетилов етер и хексан; EAFT - етилацетатен екстракт от цветовете на вратига.

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 етилацетатната фракция (вж. 5.1.). Това са фракцията от дициклохексиламониеви соли (DCHAS) и утайката получена при третиране на филтратата със смес от диетилов етер и хексан (DEHS). Инхибиращата активност на DCHAS се оказва практически същата като активността на етилацетатната фракция (Фиг. 17). От своя страна, фракцията DEHS показва слаб инхибиращ ефект. Така при концентрация на субстанциите 0.1 mg/mL, степента на инхибиране е два пъти по-ниска в сравнение с етилацетатната фракцията EACE (Фиг. 17). 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 цветовете на растението с двуфазна система вода/етилацетат, показва най-висок ефект по отношение на степента на инхибиране на активността на постпролин ендопептидазата (Фиг. 27). При този екстракт степента на инхибиране при концентрация 0.1 mg/mL е 0.85, а при концентрация 0.2 mg/mL, съответно 0.97. В този

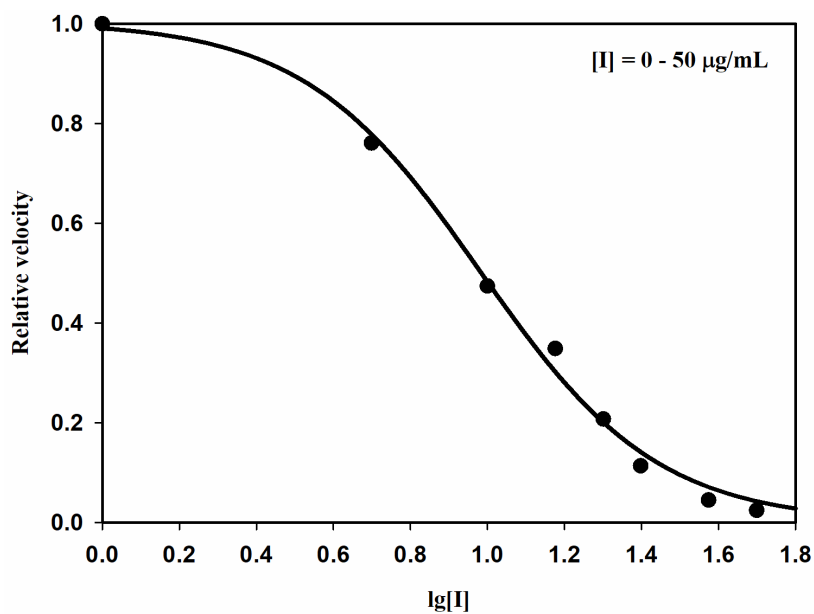
екстракт количеството на основните компоненти на единица маса е най-висок и това обяснява наблюдаваните количествени резултати.

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 18.



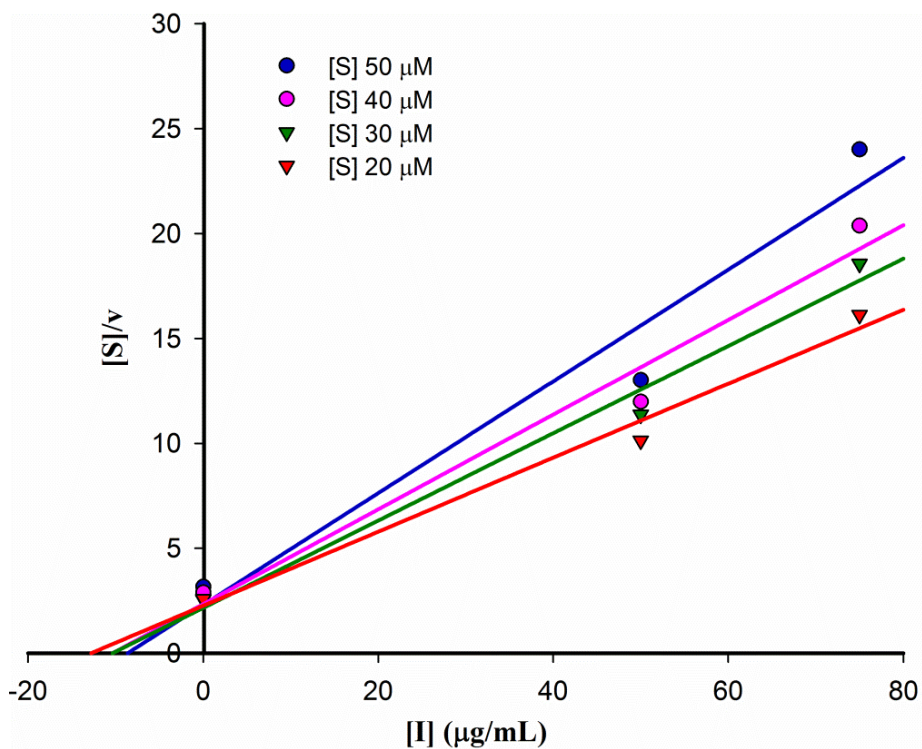
Фигура 18. Степен на инхибиране на пролин-специфичната ензимна активност от фракции от екстракта от вратига в хомогенат от MDA-MB-231. Концентрацията на фракциите в инкубационната среда е 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

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.



Фигура 19. 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.

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

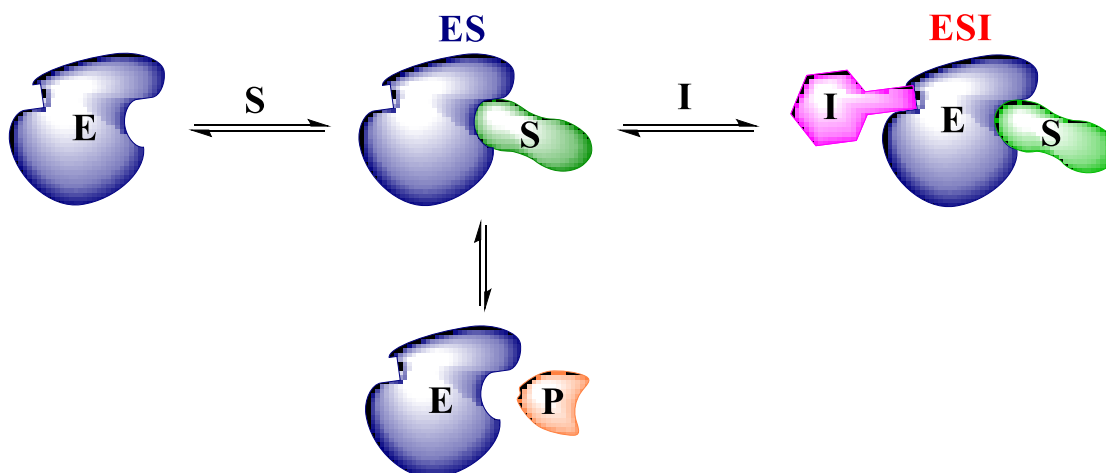


Фигура 20. Графика на Dixon за определяне на типа на инхибиране на постпролин-специфичната ензимна активност в хомогенат от MDA-MB-231.

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 $10 \mu\text{g/mL}$.

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. 20). Съгласно вида на графиката типът на инхибиране е безконкурентен. Стойността на привидната K_i е $3.2 \mu\text{g/mL}$.

Схемата на осъществяване на безконкурентно инхибиране е представена на фигура 21. Безконкурентните инхибитори взаимодействат само с ензим-субстратния комплекс (ES). Инхибиторът се свързва в алостеричен център на ензима в структурата на ES-комплекс. Това предизвиква промяна на конформацията на ензима. Свързването на инхибитора стабилизира ES-комплекса, което прави по-трудна дисоциацията на субстрата и/или затруднява преобразуването му в продукт, както и отделянето на формирания продукт от активния център на ензима.



Фигура 21. 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 хлорогени 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 екстрактите от *Tanacetum vulgare L.* е синергичен.

Изследван е ефектът на инхибиране на суровия екстракт от *Tanacetum 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 *Tanacetum 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 *Tanacetum vulgare L.*, чрез екстракция в система етилацетат/вода с рН 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 дициклохексил-амониеви соли.

Нашите изследвания показаха много висока селективност по отношение на инхибирането на пролилолигопептидазата спрямо дипептидилпептидаза IV. Безконкурентните инхибитори, каквито са компонентите в екстрактите от *Tanacetum vulgare L.*, са привлекателни за дизайна на лекарствени субстанции, тъй като те 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.
- Грант № Д-129/2018 от конкурса „Млад изследовател“ към Съвета по медицински науки на тема „ Идентифициране и биохимично охарактеризиране на хидроксицинамоилхинови киселини и флавоноиди от *Tanacetum vulgare* L. като потенциални терапевтични средства“; изпълнител-докторант на проекта.

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. In *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)* 2013 (pp. 3374-3379)
6. Gorrell MD, Park JE. Fibroblast activation protein α . In *Handbook of Proteolytic Enzymes (Third Edition)* 2013 (pp. 3395-3401)
7. Ito K, Nakajima Y, Yoshimoto T. Prolyl oligopeptidase. In *Handbook 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. In *International 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 *far* 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 II α 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 Bazı *Tanacetum* L.(Asteraceae) Taksonlarının Antioksidan Aktivitesi, Total Fenolik ve Flavonoit İçerikleri. *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 mechanism. *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- κ B 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, Nejdattari T, Ofoghi H, Iranbakhsh A. Qualitative and Quantitative Study of Quercetin and Glycyrrhizin in In Vitro Culture of Licorice (*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, Johannig 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, Chassaing 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 domestica* 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. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B 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. Dicafeoylquinic and dicafeoyltartaric 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 dicafeoylquinic 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 dicafeoylquinic 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). In *Studies 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, Arandžlović S, Radulović S, Soković M, Krstić-Milošević D, Ristić M, Čalić 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. MUREȘAN 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 Babeș-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*. In *Edible 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, İlhan 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, TUCHILUȘ 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., Dobрева 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, Dobрева DA, Panayotova V. Assessment of proximate and bioactive lipid composition of Black Sea mussels (*M. galloprovincialis*) from Bulgaria. In Biological 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 assignment 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. In *Nutrition, 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 неограничената 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*