

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ
НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

Предмет: Молба за пријаву теме докторске дисертације Филипа И. Николића, мастер хемичара, студента докторских академских студија Универзитета у Београду-Хемијског факултета.

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду-Хемијског факултета да ми одобри израду докторске дисертације из области органске хемије на Универзитету у Београду-Хемијском факултету под радним насловом:

„Специјализовани метаболити природног типа одабраних врста рода *Nepeta L.* и њихове хепатопротективне и фитотоксичне активности“.

Предлажем Комисију за оцену научне заснованости преложене теме докторске дисертације у саставу:

1. Др Веле Тешевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Хемијски факултет
2. Др Ивана Софренић, доцент, Универзитет у Београду - Хемијски факултет
3. Др Јасмина Несторовић Живковић, виши научни сарадник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду
4. Др Бобан Анђелковић, виши научни сарадник, Универзитет у Београду - Хемијски факултет
5. Др Урош Гашић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду

У прилогу достављам:

1. Образложење теме
2. Биографију
3. Библиографију
4. Изјаву да предложена тема није пријављена на другој високошколској установи у земљи или иностранству

У Београду,

31.01.2025. године

Подносилац молбе

Филип Николић
Студент докторских студија
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Биографски подаци о кандидату

Кандидат Филип Николић рођен је у Београду, 21.09.1998. године. Основну школу „Илија Гарашанин“ завршио је у Гроцкој као одличан ученик. Средњу медицинску школу завршио је у Београду 2017. године.

Основне академске студије уписао је школске 2017/2018. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Хемија и дипломирао је 2021. године са просечном оценом 8.31 (осам и 31/100). Завршни рад под насловом „Квантификација микроелемената у ткиву штитасте жлезде пацијената са Хашимотовим тиреоидитисом” одбранио је са оценом 10 (десет).

Мастер академске студије уписао је школске 2021/2022. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Хемија. Мастер академске студије је завршио 2022. године са просечном оценом 10.00 (десет и 100/100). Завршни мастер рад под насловом „Синтеза и карактеризација аренских комплекса рутенијума (II) са пиридиндикарбоксилним киселинама” одбранио је са оценом 10 (десет).

Докторске академске студије уписао је 2022. године на Хемијском факултету Универзитета у Београду, на студијском програму Хемија. Положио је шест од шест испита предвиђених планом и програмом докторских академских студија, сваки са оценом 10 (десет) и остварио је 120 ЕСПБ поена. Експериментални део докторске дисертације ради у лабораторији Центра за инструменталну анализу на Катедри за органску хемију Универзитета у Београду - Хемијског факултета и на Одељењу за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за републику Србију (ИБИСС), Универзитета у Београду.

Од августа 2022. до јула 2023. године радио је у Лабораторији за физичко-хемијска испитивања, у оквиру Сектора за контролу квалитета Института Суперлаб. Током тог периода стекао је вредно искуство у примени различитих хроматографских техника, укључујући HPLC, GC-MS и LC-MS/MS. Кандидат Филип Николић тренутно је запослен као истраживач приправник на Одељењу за физиологију биљака ИБИСС. Кандидат у оквиру аналитичке лабораторије Одељења за физиологију биљака активно учествује у истраживањима у којима примењује савремене аналитичке уређаје, попут GC-MS и UHPLC/Orbitrap-MS/MS. Ангажован је у активностима које подразумевају изолацију, структурну карактеризацију и квантификацију секундарних биљних метаболита, као и обраду метаболомичких података.

Библиографија кандидата састоји се од 7 научних публикација, од којих је 1 објављена у међународним часописима категорија M22, док је 6 представљено на научним скуповима међународног значаја у виду саопштења. Кандидат је био члан организационог одбора међународног научног скупа „5th International conference of Plant Biology (24th SPPS Meeting)“ који је одржан на Сребрном језеру од 3. до 5. октобра 2024. године у организацији Друштва за физиологију биљака Србије. Такође, Филип Николић је активно учествовао у организацији предактивности Европске ноћи истраживача 2024. године у оквиру пројекта “Road to Friday of Science FLOWs - ReFocus FLOW”, који финансира Европска комисија у оквиру “Horizon Europe” - Програма за истраживање и иновације, потпрограма «Марија Склодовска Кири» (HORIZON-MSCA-2023-CITIZENS-01 - ReFocus FLOW - 101161922).

Објављени научни радови и саопштења

Кандидат Филип Николић је коаутор рада у истакнутом међународном часопису (M22). Аутор и коаутор је саопштења на међународним научним скуповима. Досадашње резултате истраживања кандидат је публикувао у следећим научним радовима и саопштењима:

Радови објављени у истакнутом међународном часопису (M22):

Cetiz M.V., Isah M., Ak G., Bakar K., Himidi A.A., Mohamed A., Glamočlija J., Nikolić F., Gašić U., Cespedes-Acuna C.L., Zengin G. (2024). Exploring of Chemical Profile and Biological Activities of Three *Ocimum* Species From Comoros Islands. *Cell Biochemistry and Function*, 42(7):e70000.

Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу (M34):

Nikolić F., Nakarada Đ., Petrović L., Šiler B., Gašić U., Milutinović M., Nestorović Živković J., Todorović M., Mojović M., Mišić D. Waterlogging and submergence alter water mint (*Mentha aquatica* L.) specialized metabolism. Book of abstracts of the 5th international conference on plant biology, pp. 57-57, Silver lake, Serbia, 3–5. October, 2024.

Petrović L., Mišić D., Anićić N., Todorović M., Matekalo D., Milutinović M., Božunović J., Nestorović Živković J., Dmitrović S., Šiler B., Banjanac T., Filipović B., Gašić U., Nikolić F., Skorić M. Waterlogging conditions and H₂O₂ elicitation induce iridoid production in *Nepeta nuda* L. leaves, Book of abstracts of the 5th international conference on plant biology, pp. 76-76, Silver lake, Serbia, 3–5. October, 2024.

Mišić D., Skorić M., Šiler B., Gašić U., Matekalo D., Nestorović Živković J., Dmitrović S., Banjanac T., Filipović B., Milutinović M., Anićić N., Božunović J., Petrović L., Lukić T., Todorović M., Nikolić F. Biosynthesis of iridoids in catmints (*Nepeta* L.): at the crossroad between diversity and productivity, Book of abstracts of the 5th international conference on plant biology, pp. 97-97, Silver lake, Serbia, 3–5. October, 2024.

Davkova I., Gašić U., Nikolić F., Karanfilova C. I., Stefkov G., Mišić D., Karapandzova M. Phenolic and iridoid profiles in *Verbena officinalis* – insights from the UHPLC-ESI-HRMS/MS analysis, Book of abstracts of the 5th international conference on plant biology, pp 155-155, Silver lake, Serbia, 3–5. October, 2024.

Davkova I., Gašić U., Nikolić F., Trajkovska A., Karanfilova C. I., Stefkov G., Mišić D., Karapandzova M. Insights From UHPLC-ORBITRAP MS Analysis Of *Plantago major* As A Potential Herbal Drug In Wound Healing, Book of abstracts of the 12th Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, pp 58-58, Izmir, Turkey, 17-19. October, 2024.

Mišić D., Banjanac T., Matekalo D., Šiler B., Gašić U., Milutinović M., Anićić N., Petrović L., Lukić T., Dmitrović S., Nestorović Živković J., Filipović B., Božunović J., Todorović M., Nikolić F., Skorić M. Exploiting the Diversity of Iridoids within the Genus *Nepeta* L. (subfam. *Nepetoideae*, fam. Lamiaceae): from Fundamental Knowledge to Metabolic Engineering, Book of abstracts of the fifth annual conference of the Pan-Balkan alliance of natural products and drug discovery associations (PANDA), pp. 20-20, Belgrade, Serbia, 22-23. October, 2024.

ИЗЈАВА

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Специјализовани метаболити иридоидног типа одабраних врста рода *Nepeta* L. и њихове хепатопротективне и фитотоксичне активности“.

није пријављена на другим високошколским установама у земљи или иностранству.

Београд,
31.01.2025.

Филип Николић
Студент докторских студија
Универзитет у Београду – Хемијски факултет

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ-ХЕМИЈСКИ ФАКУЛТЕТ

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ

Предмет: Образложење теме докторске дисертације кандидата Филипа И. Николић, мастер хемичара, пријављене под насловом „**Специјализовани метаболити иридоидног типа одабраних врста рода *Nepeta* L. и њихове хепатопротективне и фитотоксичне активности**“.

1. **Научна област:** Хемијске науке
Ужа научна област: Органска хемија
2. **Предмет научног истраживања**

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је изоловање и структурна карактеризација специјализованих метаболита иридоидног типа из три врсте рода *Nepeta* (*Nepeta cataria* L., *Nepeta nuda* L. и *Nepeta rtanjensis* Diklić & Milojević), уз процену њихових биолошких активности. Фокус биолошких активности ће бити на хепатопротективним и фитотоксичним својствима. С обзиром да је у оквиру досадашњих фитохемијских испитивања представника овог рода изолован велики број специјализованих метаболита иридоидног типа, који су углавном иридоидни агликони, ова докторска дисертација би обухватала изоловање и иридоидних гликозида, њихову идентификацију применом савремених спектроскопских и спектрометријских метода и испитивање њихове биолошке активности.

Први део докторске дисертације обухватаће припрему и грубо раздвајање екстраката поменутих врста рода *Nepeta* применом хроматографских техника. Затим, ће се применом нуклеарне магнетне резонантне (NMR) спектроскопије и масене спектрометрије у комбинацији са течном хроматографијом (LC/MS) добити метаболнички профили њихових фракционисаних екстраката. Овако добијени резултати омогућиће поређење метаболничких профила све три испитиване врсте рода *Nepeta*. Екстракти ће затим бити испитивани на хепатопротективне активности. Резултати добијени применом инструменталних техника у комбинацији са резултатима одређивања *in vitro* хепатопротективне активности ће се користити за активношћу вођено изоловање најактивнијих једињења. Примена метода мултиваријантне анализе као што је метода парцијалне регресије најмањих квадрата (енг. *Partial least squares* - PLS) омогућиће недвосмислену детекцију једињења од интереса. Овако детектована једињења биће предмет додатних пречишћавања и изоловања, као и потпуне карактеризације применом инструменталних техника попут 1D и 2D NMR спектроскопије, инфрацрвене спектроскопије и масене спектрометрије. Изолована једињења са најбољим резултатима *in vitro* хепатопротективне активности ће даље бити предмет *in vivo* студије на модел систему гојазних пацова са масном јетром у циљу испитивања њиховог хепатопротективног потенцијала. Најзаступљенији метаболити иридоидног типа ће бити изоловани и детаљно окарактерисани, како би се тестирала фитотоксична активност.

Други део докторске дисертације биће даље највише усмерен на изоловање чистих иридоидних једињења присутних у листовима *N. cataria*, *N. nuda* и *N. rtanjensis*. И испитивање њихових биолошких активности. Посебан акценат ће бити стављен на иридоидне гликозиде, који су недовољно испитани у погледу биолошких активности. Истраживања ће обухватити процену хепатопротективних и фитотоксичних својстава како би се идентификовала једињења са највећим потенцијалом за даљу биотехнолошку и фармаколошку примену. Додатно, биће разматрани потенцијални синергистички или антагонистички ефекти између активних компоненти унутар фракција, што ће допринети разумевању њихових механизма деловања и биолошке релевантности. Фитотоксична активност различитих фракција и изолованих иридоида биће испитивана на добро познатим врстама корова који су значајни узрочници губитака приноса у пољопривреди, као што су *Amaranthus retroflexus* L., *Chenopodium album* L. и *Ambrosia artemisiifolia* L. Ове врсте не само да смањују принос и конкурентност усева, већ су неке од њих, попут *Ambrosia artemisiifolia*, и познати алергени, са значајним негативним утицајем на здравље људи. Ефекти фракција и чистих иридоидних једињења биће процењивани праћењем морфолошких (процент клијања семена, брзина раста клијанаца и развој кореновог система), физиолошких (анализа ензимских компоненти антиоксидативне заштите на биохемијском и молекуларном нивоу, интензитет фотосинтезе) и хемијских параметара (садржај антиоксиданаса), како би се утврдила њихова потенцијална примена као биолошких хербицида. Додатно, биће испитан и могући утицај на нециљане организме, укључујући пољопривредне усеве, како би се осигурала њихова селективност и безбедност у агроecosистемима. Хепатопротективни ефекти изолованих иридоида и екстракта три врсте рода *Nepeta* биће испитани на моделу гојазних мишева са масном јетром. Животиње ће бити распоређене у три групе: контролна група, гојазна група и тест група која ће, током последњих пет недеља експеримента, примати третман екстрактима. Истраживање ће обухватити процену утицаја третмана на функцију јетре, липидни профил и механизме који су повезани са инфламацијом и антиоксидативном заштитом.

3. Основне хипотезе

Род *Nepeta*, који припада потпородици *Nepetoideae* и трибусу *Nepetae*, један је од највећих родова породице *Lamiaceae*. Са више од три стотине познатих врста, род *Nepeta* углавном обухвата зељасте вишегодишње биљке, док су неке врсте и једногодишње. Врсте овог рода покривају широк спектар географских подручја, укључујући Централну и Јужну Европу, Блиски исток, Централну и Јужну Азију, као и делове Африке [1]. У флори Србије род *Nepeta* заступљен је са три врсте: *Nepeta nuda* L. (syn. *N. pannonica* L.), *N. cataria* L. и *N. rtanjensis* Diklić & Milojević. *N. nuda* је широко распрострањена вишегодишња евроазијска врста, шумско-степског типа. На територији Србије се налази на сувим ливадама, као и у светлим листопадним и зимзелним шумама на брдима и планинским масивима. *N. cataria* најшире је распрострањена и најинтензивније истраживана вишегодишња врста овог рода. Упркос својој евроазијској географској расподели, последњи подаци указују на то да је ова врста на територији Србије мање бројна него *N. nuda*. *N. rtanjensis* је стеноендемска вишегодишња врста која је у природи присутна само у једној

дисјунктној популацији која се састоји од три под-популације на јужним падинама планине Ртањ.

Етарска уља многих врста из рода *Nepeta* показала су изузетно репелентно дејство. Етарско уље *N. cataria* се нарочито истиче као ефикасан репелент против комараца из родова *Aedes* и *Culex*, као и против маларичних комараца (*Anopheles gambiae*). Поред тога, репелентна активност етарског уља *N. cataria* доказана је и против смеђег ушног крпеља (*Rhipicephalus appendiculatus*), гриња (*Dermanyssus gallinae*), бубашваба (*Blattella germanica*), као и две врсте мува (*Stomoxys calcitrans* и *Musca domestica*) [2]. Осим репелентних својстава, неколико врста из рода *Nepeta*, као што су *N. rtanjensis*, *N. nuda*, *N. cataria*, *N. mayeri*, *N. curviflora*, *N. glocephalata*, *N. flavida* и *N. ispanica*, показале су значајне фитотоксичне ефекте против добро познатих коровских врста [1,3]. Експерименти на животињама показали су да етарско уље *N. cataria* значајно смањује оштећење јетре изазвано ацетаминифеном. Испитивања су показала да и водено-алкохолни екстракт ове биљке испољава хепатопротективну активност код акутног оштећења јетре токсичним агенсима. Хепатопротективни ефекти иридоида се углавном приписују њиховој антиоксидативној и анти-инфламаторној активности. У случају болести масне јетре, хепатопротективни капацитет иридоида се огледа у њиховом доприносу на снижавање нивоа холестерола у крви, као и нивоа ензима јетре, аланин аминотрансферазе и аспартат аминотрансферазе [4].

Изоловање вођено активношћу је систематски приступ који се користи у истраживању природних производа за екстракцију и идентификацију биоактивних једињења из различитих извора, првенствено биљака. Овај метод наглашава везу између биолошке активности једињења и процеса њиховог изоловања, омогућавајући истраживачима да се фокусирају на она једињења која показују значајан терапеутски потенцијал [5]. Мултиваријантна анализа представља скуп статистичких алата и метода намењених да се из огромне количине података математичким путем дође до заједничких именитеља или разлика између испитиваних узорака [6]. Од метода најчешће се користе анализа главних компоненти и PLS. PLS је статистичка метода базирана на регресији главних компоненти која се најчешће користи за проналажење зависности између хемијског састава испитиване серије узорака и њихове биолошке активности.

Широк спектар биолошких активности врста из рода *Nepeta* углавном се приписује најзаступљенијим монотерпенима међу врстама рода *Nepeta* иридоидима, који се јављају или као прости иридоиди (ИА) или као иридоид гликозиди (ИГ). Карактеристичан представник групе ИА је непеталактон, бициклични монотерпеноид који се искључиво налази у врстама рода *Nepeta* и јавља се у облику различитих диастереоизомера, али и деривата попут 5,9-дехидронепеталактона или непеталне киселине. Иридоидни гликозиди као што су 1,5,9-епидеоксилоганинска киселина, непетариазид, аукубин и др., карактеришу се присуством шећерне компоненте која се обично налази на позицији С-1. Већина до сада истражених биолошких активности примарно се приписује ИА, са нагласком на непеталактон као најзаступљенији метаболит. Насупрот томе, подаци о биолошким активностима ИГ рода *Nepeta* су изузетно оскудни, посебно када је реч о њиховом хепатопротективном

и фитотоксичном дејству. На основу квалитативног састава иридоида, тј. присуства ИГ и/или ИА, представници овог рода могу се поделити у три карактеристична хемотипа: 1) врсте које продукују ИА и ИГ, 2) врсте које продукују само ИГ и 3) врсте које уопште не продукују иридоиде. Ове две групе иридоида (ИА и ИГ) у истраживањима се врло ретко изучавају паралелно, пошто њихова идентификација и квантификација подразумева употребу различитих аналитичких метода (GC/MS, UHPLC/HRMS, UHPLC/MS, UHPLC/DAD и др.). Врсте рода *Nepeta* које ће бити анализирани у овој докторској дисертацији припадају групи врста које продукују и ИА и ИГ, мада је *N. nuda* претходно окарактерисана као нископродуктивна врста у погледу садржаја непеталактона и његових деривата.

Детаљна истраживања показала су да се биосинтеза иридоида код врста из рода *Nepeta* одвија преко непеталактола, и сматра се да је овај део биосинтетског пута исти код свих биљака које продукују иридоиде. Ово једињење, препознато као заједнички прекурсор свих иридоида у биљном царству, настаје од 8-оксогераниала, у реакцијама које каталишу ензими иридоид синтаза (IS) и непеталактолу-блиске кратколанчане дехидрогеназе/редуктазе (NEPS) из групе циклаза. Циклазе NEPS типа су одговорне за успостављање стереохемије молекула непеталактола, који се даље конвертују у одговарајуће стереоизомере непеталактона у реакцијама које су посредоване NEPS оксидазама [7]. Међутим, ензими који учествују у каснијим фазама биосинтезе, укључујући и оне одговорне за формирање иридоидних гликозида, још увек нису идентификовани.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Основни циљ докторске дисертације је изоловање, пречишћавање и структурна карактеризација иридоидних једињења из три врсте рода *Nepeta*, са посебним акцентом на иридоид гликозиде. Изолована једињења биће испитана у погледу њихове хепатопротективне и фитотоксичне активности, с циљем детаљног утврђивања њиховог биолошког потенцијала и механизма деловања.

Посебна пажња биће посвећена испитивању њиховог утицаја на различите коровске врсте и ћелије јетре, како би се утврдиле могућности њихове потенцијалне примене у развоју нових биохербицида и хепатопротективних препарата. Ово истраживање има за циљ да допринесе бољем разумевању биолошких функција иридоидних једињења и њиховом потенцијалу за примену у биотехнологији, фармакологији и заштити животне средине.

5. Методе истраживања

Екстракције, фракционисање и изоловање иридоидних гликозида ће се радити на Универзитета у Београду-Хемијском факултету. За изоловање ових једињења користиће се различите методе екстракције и хроматографске технике. Резултати ^1H NMR спектроскопије и LC/MS хроматографије грубо пречишћених фракција као и тестирања *in vitro* хепатопротективне активности представљаће улазне елементе мултиваријантне анализе применом SIMCA програма. За одређивање структура изолованих једињења биће примењене савремене инструменталне технике: 1D (^1H и

^{13}C) и 2D (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, HMBC) NMR, IR, UV, као и комбинације GC/MS и LC/MS.

Истраживање биолошких активности ће се обавити у лабораторијама Одељења за физиологију биљака и Одељења за биохемију Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Института од националног значаја за Републику Србију (ИБИСС). У експерименталном раду, као полазни биљни материјал користиће се биљне врсте *N. nuda* и *N. cataria* сакупљене на одабраним локалитетима у Србији. Биљни материјал врсте *N. ranjesis*, биће обезбеђен из услова стакленика и са експерименталног поља ИБИСС, јер се ради о крајње угроженој биљној врсти.

Фитотоксична активност ће бити испитана у лабораторијским условима, применом различитих концентрација изолованих чистих једињења и фракција на одабране како коровске врсте (*A. retroflexus*, *C. album*, *A. artemisiifolia*, и *A. thaliana*) тако и усева (*Lycopersicon esculentum*). Ефекти фракција и чистих иридоидних једињења са акцентом на иридоидне гликозиде биће процењивани кроз параметре као што су проценат клијања семена, брзина раста клијанаца и развој кореновог система. Ефекти ће такође бити праћени на нивоу антиоксидативних ензима, анализом њихове активности (спектрофотометријски, *Native-PAGE*, *SDS-PAGE*) и експресије (имунодетекција протеина, експресија гена). Екстракција протеина из таргет-организама биће урађена помоћу екстракционог пуфера-50 mM Tris pH 8, етилен диамин тетра сирћетна киселина (EDTA), 30% глицерол, 1.5% (w/v) поливинилполипиролidon (PVPP), 10 mM дитиоетритол (DTT), и 1 mM фенилметилсулфонил флуорид (PMSF). Концентрација протеина биће одређена употребом високо сензитивног *Qubit® 3.0 Fluorometer (Invitrogen)*. Екстракција РНК из таргет-организама биће извршена модификованом *СТАВ* методом. Након одређивања концентрације и провере квалитета изоловане РНК спектрофотометријским (нанодроп или спектрофотометар) и флуорометријским (*Qubit* флуориметар) методама, РНК ће бити чувана на $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Експресија гена од интереса биће праћена коришћењем методе квантитативни PCR у реалном времену (*quantitative PCR -qPCR*). За потребе ове методе изолована РНК ће бити коришћена као матрица за синтезу комплементарне ДНК. Гени од интереса обухватаће гене који кодирају за ензиме антиоксидативног система (геранил дифосфат синтаза (GPPS), гераниол синтаза (GES), гераниол 8-оксидаза (G8O), хидроксигераниол оксидоредуктаза (8HGO), IS и NEPS). Док ће антиоксидативни ензими од интереса обухватити супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), аскорбат пероксидаза (APX) и гвајакол пероксидаза (GPX).

Хепатопротективни ефекти иридоида ће бити испитани на анималном моделу гојазног миша са масном јетром. Истраживање ће бити спроведено на мужјацима мишева соја C57BL/6J старих 2,5 месеца од којих ће бити формиране три експерименталне групе:

1. Контролна група (n=10) – животиње које ће током 14 недеља бити храњене стандардном комерцијалном храном са 10% масти (D12450B, Research Diets, Inc., NJ, USA);
2. Гојазна група (n=10) – животиње које ће током 14 недеља бити храњене храном са 60% масти (D12492, Research Diets, Inc., NJ, USA)

3. Тест група (n=10) - животиње које ће током 14 недеља бити храњене храном са 60% масти (D12492, Research Diets, Inc., NJ, USA), а последњих 5 недеља третмана добијати оралном гаважом одабране екстракте.

Храна и вода ће свим животињама бити доступне *ad libitum* током трајања експеримента. Животиње ће бити гајене у стандардним лабораторијским условима који подразумевају дефинисан дневно-ноћни циклус осветљења са сменом на 12 сати и константну температуру од $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Током 14 недеља третмана биће мерен унос хране и промене у телесној маси. Три дана пре жртвовања биће урађен интраперитонеални тест оптерећења глукозом (IP-GTT, енг. *Intraperitoneal glucose tolerance test*). Све процедуре са животињама ће бити изведене у складу са препорукама Директиве Европске комисије о добробити животиња (2010/63/EU), уз дозволу Етичке комисије Управе за ветерину, овлашћене институције Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије.

Парафински пресеци јетре ће бити анализирани бојењем хематоксилином и еозином уз софтверску морфометријску анализу. Заступљеност гликогена у јетри биће испитана применом PAS бојења, док ће тројним бојењем по Masson-у бити испитана фиброза јетре. Концентрације биохемијских и хормонских параметра биће одређене у крвним серумима следећим методама: концентрација глукозе помоћу аутоматског анализатора *Accu-Chek Active*®, концентрације триглицерида, слободних масних киселина и холестерола комерцијалним колориметријским тестовима. Молекулски механизми укључени у синтезу триглицерида у јетри, развој инфламације и антиоксидативну заштиту биће испитани на нивоу експресије одговарајућих гена методом квантитативног PCR у реалном времену (*qPCR*), док ће ниво протеина бити одређен методом *Western blot*-а. Сви резултати ће бити статистички обрађени применом једнофакторијалне анализе варијансе ако расподела података буде нормална (*One-way ANOVA* праћена *Bonferroni post hoc* тестом) или непараметријским тестом ако расподела буде одступала од нормалне (*Kruskal-Wallis* тест праћен *Mann-Whitney U post hoc* тестом са *Bonferroni* корекцијом).

6. Литература

[1] Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F. (2011). Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species. *Chemistry and Biodiversity*, 8:1783–1818. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000191>

[2] Birkett, M., Hassanali, A., Høglund, S., Pettersson, J., Pickett J. (2011). Repellent activity of catmint, *Nepeta cataria*, and iridoid nepetalactone isomers against Afro-tropical mosquitoes, ixodid ticks and red poultry mites. *Phytochemistry*, 72(1):109-114. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.09.016>

[3] Mutlu, S., Atici, O., Esim, N., Mete, E. (2011). Essential oils of catmint (*Nepeta meyeri* Benth.) induce oxidative stress in early seedlings of various weed species. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 943–951. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0626-3>

[4] Madrigal-Santillán, E., Madrigal-Bujaidar, E., Álvarez-González, I., Sumaya-Martínez, M. T., Gutiérrez-Salinas, J., Bautista, M., Morales-González, Á., García-Luna y González-

Rubio, M., Aguilar-Faisal, J. L., & Morales-González, J. A. (2014). Review of natural products with hepatoprotective effects. *World Journal of Gastroenterology*, 20(40), 14787–14804. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i40.14787>

[5] Han, J., Zhang J., He W., Huang P., Oyeleye A., Liu X., Zhang L. (2015). Bioassay-Guided Identification of Bioactive Molecules from Traditional Chinese Medicines. In: Hempel, J., Williams, C., Hong, C. (eds) *Chemical Biology. Methods in Molecular Biology*, vol 1263. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_15

[6] Farajpour, M., Ebrahimi, M., Sadat-Hosseini, M., Al-Fekaiki D., Baghizadeh A. (2024). Multivariate analysis of the phytochemical composition and antioxidant properties in twenty-five accessions across three *Achillea* species. *Scientific Reports* 14, 11843. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62834-1>

[7] Lichman, B.R., Kamileen, M.O., Titchiner, G.R., Saalbach, G., Stevenson, C.E.M., Lawson, D.M., O'Connor, S.E. (2019). Uncoupled activation and cyclization in catmint reductive terpenoid biosynthesis. *Nature Chemical Biology*, 15(1):71–79. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0185-2>