

UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DOKTORSKE STUDIJE

UNIVERZITET CRNE GORE
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Broj: 2024/01-1749/1
08.07. 2024 god.

VIJEĆU PRIRODNO-MATEMATIČKOG FAKULTETA

Predmet: Prijava teme doktorske disertacije i predlog Komisije za ocjenu podobnosti teme i kandidata

U skladu sa članom 32 Pravila doktorskih studija, doktorand **Kenan Preljević** je 2. 7. 2024. god. Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta podnio **Prijavu teme doktorske disertacije (PD Obrazac** sa pratećom dokumentacijom) pod naslovom "***In vitro i in vivo* istraživanje biološke aktivnosti i hemijske karakterizacije ekstrakata iz familije *Lamiaceae* sa područja Crne Gore**".

Komisija za doktorske studije PMF-a je na elektronskoj sjednici održanoj 2. 7. 2024. god. razmatrala formalne uslove dostavljene prijave sa stanovišta neophodnih podataka i ispunjavanja uslova za prijavu teme i podnosi Vijeću

P R E D L O G

sastava **Komisije za ocjenu podobnosti teme i kandidata:**

1. **Dr Svetlana Perović**, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore
2. **Dr Slađana Krivokapić**, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta Crne Gore
3. **Dr Biljana Damjanović-Vratnica**, redovni profesor Metalurško-tehnološkog fakulteta Univerziteta Crne Gore

Podgorica, 5. 7. 2024. god.

ZA KOMISIJU ZA DOKTORSKE STUDIJE

Goran Popivoda





PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	MSc Kenan Preljević
Fakultet	Prirodno-matematički fakultet
Studijski program	Biologija
Broj indeksa	5/22
Ime i prezime roditelja	Zeko Preljević / Hajrija Kuduk
Datum i mjesto rođenja	19.11.1997. Prijepolje, Srbija
Adresa prebivališta	Sunčana 37, Talum, Berane 84 300, Crna Gora
Telefon	069/868-064
E-mail	kaan.preljevic@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	- Magistarske studije - Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program: Eksperimentalna biologija i biotehnologija, godina završetka 23.12.2021., srednja ocjena 10,00 (A) - Specijalističke studije - Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program: Eksperimentalna biologija i biotehnologija, godina završetka 03.07.2020., srednja ocjena 9,97 (A) - Osnovne akademske studije, Univerzitet Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet, Studijski program za Biologiju, godina završetka 09.07.2019., srednja ocjena 8,08 (C)
Radno iskustvo	Poliklinika Standard, Laboratorija Standard – Bar Pozicija: Rukovodilac kvaliteta laboratorije (15.06.2022. – Trenutno) Dnevna bolnica „Dr Zejnilović“ – Bar Pozicija: Biolog na departmanu za Molekularnu biologiju i PCR dijagnostiku (11.10.2021. – 01.06.2022.) Domaća trgovina DOO – Podgorica Pozicija: Menadzer u sektoru operacije (01.04.2021. – 01.10.2023.) Pozicija: Biolog na sektoru Kontrola i bezbjednost hrane (tehnologija i mikrobiologija hrane) Fondacija za Promovisanje nauke Crne Gore (Prona) Departman za biologiju - Pripravnički staž (15.01.2020. – 15.10.2020.)
Popis radova	Preljević, K., Pašić, I., Vlaović, M., Matić, I. Z., Krivokapić, S., Petrović, N., ... & Perović, S. (2024). Comparative analysis of chemical profiles, antioxidant, antibacterial, and anticancer effects of essential oils of two Thymus species from Montenegro. Fitoterapia, 105871.

NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	<i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> istraživanje biološke aktivnosti i hemijske karakterizacije biljnih ekstrakata iz porodice <i>Lamiaceae</i> sa područja Crne Gore
Na engleskom jeziku	<i>In Vitro</i> and <i>In Vivo</i> Investigation of Biological Activity and Chemical Characterization of Plant Extracts from the <i>Lamiaceae</i> Family in the Region of Montenegro
Obrazloženje teme Biološki aktivne komponente biljaka, poznate kao sekundarni metaboliti biljaka predmet su brojnih naučnih istraživanja imajući saznanje da posjeduju izuzetan biološki efekat, prije svega antioksidativni, antimutageni/antikancerogeni, anti-inflamatorni, citotoksični i dr. Sintetski antioksidansi danas se sve više zamjenjuju prirodnim antioksidansima, zbog njihove toksičnosti i sumnje da su izazivači kancera. Trend zamjene sintetskih jedinjenja sa prirodnim aktivnim komponentama usmjerava istraživanja u pravcu ispitivanja različitih biljnih materijala i identifikovanja novih jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom koji se mogu iz njih izolovati. Zbog toga su veliki naponi uloženi u cilju pronalaženja jeftinih izvora prirodnih antioksidanasa, kao i za razvoj efikasnih i selektivnih tehnika ekstrakcije. Porodica biljaka <i>Lamiaceae</i> obuhvata veliki broj aromatičnih biljaka, koje su bogate polifenolnim i terpenoidnim jedinjenjima i samim tim poznate po brojnim biološkim učincima, zbog čega su našle široku primjenu u tradicionalnoj i savremenoj medicini. Cilj ove studije je da se ispita fitohemijski sadržaj ekstrakata različitih predstavnika iz porodice <i>Lamiaceae</i> i na osnovu tog sadržaja ispituju biološke aktivnosti tih ekstrakata na mnoge efekte: antioksidativne, antimikrobne, toksične na ćelijskim linijama, antikancerogene u <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> uslovima, kao i uticaj na ekspresiju ciljanih gena. Pregled istraživanja Porodica <i>Lamiaceae</i> (usnatice) predstavlja porodicu aromatičnih biljaka koja obuhvata oko 6000 predstavnika. Većina biljaka koje pripadaju ovoj porodici sadrže etarska ulja, stoga nalaze veliku primjenu u farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji u biokontroli u poljoprivredi. Neki predstavnici koji su našli praktičnu primjenu su menta, bosiljak, ružmarin, satureja i dr. Predstavnici iz porodice <i>Lamiaceae</i> su izuzetno bogati sekundarnim metabolitima, kao što su polifenoli (falvonoidi i tanini), ali i terpenima. U skladu sa tim, ove biljke i preparati ispoljavaju brojne biološke aktivnosti: antimikrobne, antioksidativne, anti-inflamatorne i druge (Carović-Stanko <i>et al.</i>, 2016). Hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja iz porodice <i>Lamiaceae</i> je od velikog značaja, posebno biljaka sa područja Crne Gore, jer ovi podaci doprinose razvoju hemotaksonomije i postavljanju jasnih razlika između vrsta. Razlike u hemijskom sastavu između vrsta, ali i između jedinki jedne te iste populacije su evidentne i one proizilaze usljed djelovanja različitih faktora: klimatski faktori, oprašivanje, nadmorska visina i genetičke predispozicije. Biljke iz porodice <i>Lamiaceae</i> su bogate flavonoidima i terpenima, ali neki predstavnici se odlikuju i po prisustvu glikozidnih iridoide, usljed čega proističe i njihova gorčina. Tipični primjer ovakvih biljaka jeste <i>Phlomis fruticosa</i>, koja se odlikuje visokim sadržajima flavonoida, poput: kempferola, luteolina, naringenina i hesperitina (Amor <i>et al.</i>, 2009; Marin <i>et al.</i>, 2007; Ramos de Silva <i>et al.</i>, 2021). Pored biljaka iz roda <i>Phlomis</i>, tradicionalnoj medicini poznate su i biljke iz roda <i>Teucrium</i>. Trava iva (<i>Teucrium montanum</i>) koristi se u različitim sistemima medicine kao lijek koji snižava povišenu temperaturu, ali i stimuliše rad imunog sistema. Trava iva, kao i druge vrste iz roda <i>Teucrium</i> sadrže etarska ulja, koja su bogata brojnim terpenoidnim jedinjenjima, uključujući germakren D, δ-kadinen, β-selinen i druga. U skladu sa tim da se biljke iz roda <i>Teucrium</i> odlikuju izuzetno bogatim hemijskim sadržajem, poznato je da ekstrakti	

i etarska ulja ispoljavaju i antimikrobni i antioksidativni efekat. Produkti na bazi ovih biljaka prepoznati su kao efikasna sredstva u borbi protiv nekih patogenih bakterija, poput: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* itd. Rezultati istraživanja koja se bave problematikom mikrobne rezistencije i testiranjem novih antimikrobnih agenasa na bazi aromatičnih biljaka, od velikog su značaja zbog kontrole infekcija patogenih bakterija, koje su stvorile rezistenciju na brojne antibiotike. Produkti aromatičnih biljaka sadrže veliki broj sekundarnih metabolita koji djeluju sinergistički, kroz nekoliko različitih mehanizama, i na taj način dovode do inhibicije rasta bakterija i gljivica. Biljke poput *Ajuga reptans* i *Ajuga genevensis* poznate su i po svojim antifungalnim efektima, inhibirajući rast gljivica poput: *Aspergillus niger* i *Candida albicans* (Vuković et al., 2008; Mandura Jarić et al., 2023; T'oui et al., 2019).

Utvrđeno je da fenoli i sekundarni metaboliti sa konjugovanim dvostrukim vezama pokazuju jako antioksidativno djestvo. Flavonoidi mogu da ostvare svoje antioksidativne funkcije sprečavanjem stvaranja ROS (zahvaljujući njihovoj sposobnosti da heliraju jone prelaznih metala kao što su Fe i Cu) i uklanjanjem već formiranih reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). Antocijanini su, takode, efikasni donori vodonika. Zbog pozitivnog naboja antocijanina, broja i rasporeda aromatičnih hidroksilnih grupa i opsega strukturnih konjugacija lako mogu donirati vodonikove jone visoko reaktivnim slobodnim radikalima i samim tim spriječavati dalje formiranja radikala. Ovo štiti ćelije od oksidativnih oštećenja, koja su glavni uzrok mnogim bolestima. Brojne biljke iz porodice *Lamiaceae* prepoznate su po svojim antioksidativnim efektima, poput predstavnika iz roda žalfija - *Salvia verticillata*. Takode, trava iva, koja važi za veliki lijek u narodnoj medicini, gdje se pominje i u izreci „Trava iva od mrtva pravi živa“, odlikuje se izuzetno bogatim fitohemijskim sadržajem koji korelira sa snažnim antioksidativnim efektima (Bueno et al., 2012; Di Ferdinando et al., 2011; Mandura Jarić et al., 2023; Eghbaliferiz et al., 2019).

Pored bioloških aktivnosti, antimikrobne i antioksidativne, značajno je pomenuti i antikancerogenu aktivnost. Savremena istraživanja na polju biomedicinskih nauka usmjerena su ka traganju novih antikancerogenih agenasa na bazi biljaka. Kontrola i prevencija kancera od velikog su značaja za humanu populaciju, a liječenje i prevencija biljkama jedan je od obećavajućih načina. Predstavnici porodice *Lamiaceae*, takode ispoljavaju antikancerogenu aktivnost. Produkti vrste *Clinopodium vulgare* ispoljavaju jaku antitumorsku aktivnost u *in vitro* uslovima na A2058, Hep-2, I.5178Y ćelijskim linijama kancera, ekstrakti vrste *Satureja montana* ispoljavaju antiproliferativna svojstva, dok ekstrakti vrste *Satureja khuzestanica* ispoljavaju antikancerogenu aktivnost prema ćelijama kancera prostate (Vladić et al., 2020; Kazemi et al., 2021; Dzhambazov et al., 2002).

Cilj i hipoteze

Ciljevi:

1. Determinacija polifenolnih jedinjenja: fenola, flavonoida, monomernih antocijanina u odabranim biljnim ekstraktima predstavnika porodice *Lamiaceae*, primjenom tehnika kao što su visokoeffikasna tečna hromatografija (HPLC) ili spektrofotometrija.
2. Ispitivanje sadržaja minerala i kvantifikacija nutritivnog sadržaja biljnih ekstrakata u odabranim biljnim ekstraktima predstavnika porodice *Lamiaceae*.
3. Određivanje *in vitro* antioksidativnog potencijala dobijenih ekstrakata iz odabranih predstavnika porodice *Lamiaceae* pomoću detekcije DPPH radikala i FRAP.
4. Ispitivanje antioksidativnog efekta biljnih ekstrakata na ćelijskim linijama nakon indukovanja oksidativnog stresa H₂O₂.
5. Određivanje antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata na bakterijskim sojevima iz ATCC kolekcije i kliničkim izolatima Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija mikrodilucionim metodom.

6. Određivanje antifungalne aktivnosti mikrodilucionom metodom na ATCC kolekcijama i kliničkim izolatima gljivica.
7. Ispitivanje citotoksičnog djelovanja biljnih ekstrakata na ćelijskim linijama: adenokarcinom cerviksa HcLa, maligni melanom A375, adenokarcinom dojke MDA-MB-231, kolorektalni adenokarcinom LS 174T, karcinom pluća A549, kao i prema neizmijenjenim humanim keratinocitima HaCaT.
8. Ispitivanje uticaja biljnih ekstrakata na distribuciju ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa.
9. Ispitivanje dejstva biljnih ekstrakata na indukciju ćelijske smrti malignih ćelija nakon perioda inkubacije od 24h i 48h.
10. Ispitivanje djelovanja biljnih ekstrakata na ekspresiju MMP2, MMP9 i VEGFA gena.
11. Ispitivanje genotoksičnog efekta biljnih ekstrakata na neizmijenjenim humanim HaCaT keratinocitima primjenom alkalnog komet testa (Comet assay).
12. Ispitivanje akutne toksičnosti u *in vivo* uslovima limit testom na model organizmima (Wistar pacovi), uz praćenje promjena opšteg stanja životinja, promjena težine, unosa vode i hrane.
13. Izvođenje postupka velike nekropsije – detaljnog vizuelnog pregleda tijela životinje nakon smrti, kako bi se utvrdile patološke ili anatomske promjene.
14. Analiza rezultata istraživanja i statistička obrada.

Hipoteze:

1. Pretpostavlja se da biljni ekstrakti odabranih vrsta iz porodice *Lamiaceae* posjeduju odgovarajući fitohemijski sadržaj koji dovodi do neutralizacije slobodnih radikala heliranjem metalnih jona i transferom vodoničnih jona, odnosno smanjenja oksidativnog stresa indukovano peroksidom (H_2O_2) pod uticajem biljnih ekstrakata.
2. Sadržaj fenola, flavonoida, monomernih antocijanina i minerala u biljnim ekstraktima doveste do inhibicije rasta bakterijskih i gljivičnih kultura, i pokazaće različite stepene senzitivnosti u zavisnosti od koncentracije tih jedinjenja u biljnim ekstraktima različitih biljaka.
3. Sadržaj biološki aktivnih jedinjenja u biljnim ekstraktima izazvaće toksično dejstvo prema malignim ćelijama i pokazati različitu selektivnost prema efektu biljnih ekstrakata u odnosu na normalne ćelije.
4. Sadržaj biološki aktivnih jedinjenja u biljnim ekstraktima ispoljiće anti invazivno dejstvo, smanjenjem ekspresije gena: VEGF-A (Vaskularni endotelni faktor rasta A), MMP2 (Matriks metaloproteinaze 2) i MMP9 (Matriks metaloproteinaze 9), kao i antikancerogeni potencijal i dovesti do ćelijske smrti malignih ćelija.
5. Očekuje se da će LD50 vrijednost toksičnosti za Wistar pacove u *in vivo* uslovima biti veća od 2000 mg/kg, što bi ukazalo na sigurnu upotrebu sadržaja biljnih ekstrakata do te koncentracije. Praćenje promjene mase životinja, unosa vode i hrane, kao i rezultati velike nekropsije pružiće dodatni uvid u bezbjednost ispitivanih biljnih materijala i potvrditi njihovu netoksičnost na opšte fiziološko stanje životinja.

Materijali, metode i plan istraživanja

Biljni materijal prikupljen je u toku perioda proljeća i ljeta 2023. godine u različitim djelovima Crne Gore. Prikupljeni su nadzemni dijelovi biljaka (stabljika, list i cvijet) - odabranih predstavnika iz porodice *Lamiaceae* (*Labiatae*). Materijal je prikupljen na različitim nadmorskim visinama, od 8 metara iznad nivoa mora, pa do 1533 metra nadmorske visine. Na taj način biljne populacije bile su izložene različitim uticajima različitih klimatskih faktora. Nakon prikupljanja biljnog materijala, pojedinačni uzorci su herbarizovani s ciljem determinacije i

dobijanja herbarskog broja. Biljni materijal je determinisan na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta Crne Gore, na Studijskom programu Biologija, u laboratoriji za botaniku. Materijal je determinisan od strane Prof. dr Danijele Stešević i dodijeljen mu je Voucher Number.

Spisak biljnih vrsta koje će se koristiti u istraživanju:

1. *Tenacium montanum* L.
2. *Tenacium capitatum* L.
3. *Phlomis fruticosa* L.
4. *Clinopodium alpinum* L.
5. *Ajuga reptans* L.
6. *Satureja subspicata* Bartl. Ex Vis.
7. *Salvia bertolonii* Vis.

*Za procjenu toksičnosti u *in vivo* uslovima koristeći se model organizmi (Wistar pacovi), i za ovu vrstu istraživanja dobijena je saglasnost od Etičke komisije Srbije.

Nakon adekvatnog sušenja u zamračenom prostoru i ostalih predtretmana, determinisani materijal će se usitniti, kako bi se od njega dobio prah, koji će se koristiti za dobijanje ekstrakata. Kao tip ekstrakcije koji će se koristiti za pripremu ekstrakata predviđena je ultrazvučna ekstrakcija. Koristiće se dva tipa rastvarača: 70% etanol i destilovana voda. Po završetku ekstrakcije uzorci će se filtrirati, kako bi se prečistili od partikula i skladištiti u mraku, na temperaturi od 4°C do dalje upotrebe.

1. Hemijska karakterizacija

Za determinaciju ukupnog sadržaja fenola, flavonoida, monomernih antocijanina koristiće se kvantitativne i kvalitativne metode detekcije. Jedna od metoda koja će se koristiti je HPLC (Tečna hromatografija visokih performansi). Takođe, u biljnim ekstraktima determinisaće se i sadržaj minerala, kao i sadržaj nutritivnih komponenti.

2. Određivanje antioksidativnog efekta u *in vitro* uslovima:

Za određivanje antioksidativnog potencijala biljnih ekstrakata koristiće se metode, koje se baziraju na različitim mehanizmima, kako bi se izveli što adekvatniji zaključci o mogućnosti spriječavanja oksidativnog stresa:

- određivanje antioksidativnog efekta DPPH metodom;
- određivanje antioksidativnog efekta FRAP metodom;
- ispitivanje uticaja biljnih ekstrakata na intraćelijski nivo reaktivnih vrsta kiseonika
- ispitivanje uticaja biljnih ekstrakata na nivo reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) (oksidativni stres) u malignim ćelijama i neizmenjenim ćelijama nakon 24 h inkubacije primjenom 2',7' dihlorohidrofluorescein diacetata i protočne citometrije (IC₅₀ i IC₃₀ koncentracije ekstrakata).
- ispitivanje efekta biljnih ekstrakata na smanjenje nivoa oksidativnog stresa u neizmenjenim ćelijama koji je uzrokovan vodonik peroksidom. Intenzitet zelene fluorescencije koju emituje generisani dihlorofluorescein biće određen na FACS Calibur protočnom citometru.

Neposredno prije početka izvođenja testova u *in vitro* istraživanjima na živim ćelijama, kao i prije izvođenja *in vivo* istraživanja na eksperimentalnim životinjama, neophodno je liofilizirati biljne ekstrakte, pri čemu će se za dalje potrebe istraživanja koristiti isključivo liofilizat biljnih ekstrakata.

3. Određivanje antimikrobne aktivnosti:

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti biljnih ekstrakata koristiće se disk-difuzioni metod i mikrodiluzioni metod na odabranim bakterijskim i gljivičnim kulturama iz ATCC kolekcije i kliničkim izolatima. Mikrodiluzioni metod će se koristiti s ciljem određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) djelovanja biljnih ekstrakata na bakterijskim i gljivičnim kulturama.

4. Ispitivanje citotoksičnog dejstva biljnih ekstrakata:

Intenzitet citotoksičnog dejstva biljnih ekstrakata će se odrediti na sledećim humanim malignim

ćelijskim linijama: adenokarcinom cerviksa HeLa, maligni melanom A375, adenokarcinom dojke MDA MB 231, kolorektalni adenokarcinom LS 174T, karcinom pluća A549, kao i prema

neizmenjenim humanim keratinocitima HaCaT. Preživljavanje ćelija nakon 72 časa inkubacije u prisustvu ekstrakata biće određeno primjenom MTT kolorimetrijskog testa. Za svaki ekstrakt

odrediće se IC_{50} vrijednost, koja se definiše kao koncentracija ekstrakta koja za 50% inhibira preživljavanje ćelija, u odnosu na kontrolni uzorak ćelija.

5. Ispitivanje uticaja biljnih ekstrakata na distribuciju ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa:

U cilju daljeg ispitivanja mehanizama citotoksičnog dejstva biljnih ekstrakata odrediće se procentualna zastupljenost odabranih humanih malignih ćelija u fazama ćelijskog ciklusa protočnom citometrijom nakon 24 h i 48 h tretmana IC_{50} i $2IC_{50}$ koncentracijama ekstrakata. Neposredno prije analize na protočnom citometru uzorci ćelija će biti tretirani ribonukleazom A nakon čega će se odrediti procenat ćelija u subG1, G1, S i G2/M fazama ćelijskog ciklusa za kontrolne i tretirane uzorke ćelija primjenom BD FACSCalibur™ protočnog citometra i CellQuest Pro™ softvera (BD Biosciences).

Takode, ispitaće se da li ekstrakti dovode do apoptotske ćelijske smrti odabranih malignih ćelija nakon 24h ili 48h inkubacije. Odrediće se procentualna zastupljenost živih malignih ćelija, kao i onih u ranim i kasnim stadijumima apoptoze ili nekroze metodom protočne citometrije nakon bojenja ćelija primjenom aneksina V konjugovanog sa fluoroforom FITC (engl. Fluorescein isothiocyanate, FITC) i propidijum jodida, prema protokolu proizvođača BD Pharmingen. Ukoliko se pokaže da biljni ekstrakti izazivaju apoptozu malignih ćelija, odrediće se ciljne kaspaze preko kojih ekstrakti ostvaruju svoje dejstvo primjenom specifičnih ireverzibilnih peptidnih inhibitora kaspaza: Z-DEVD-FMK, inhibitor kaspaze-3, Z-LEHD-FMK, inhibitor kaspaze 8 i Z-IETD-FMK, inhibitor kaspaze 9. Uzorci ćelija će biti tretirani odgovarajućim inhibitorom 2 h prije dodavanja rastvora ekstrakta i zatim inkubirani naredna 24 h. Zatim će se uraditi analiza faza ćelijskog ciklusa, odnosno odrediti procenat ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa.

6. Ispitivanje efekta biljnih ekstrakata na ekspresiju MMP2, MMP9 i VEGFA gena:

Moguća *in vitro* anti-invazivna svojstva biljnih ekstrakata će biti ispitana na odabranoj humanoј malignoj ćelijskoј liniji određivanjem ekspresije gena koji kodiraju matriksnu metaloproteinazu 2 (MMP2), matriksnu metaloproteinazu 9 (MMP9) i vaskularni endotelni faktor rasta A (VEGFA) nakon 24 h tretmana ćelija subtoksičnim koncentracijama ekstrakata. Ekspresija gena u kontrolnim i tretiranim uzorcima ćelija će biti određena primjenom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu i TaqMan® escja.

7. Ispitivanje genotoksičnog efekta ekstrakata komet testom:

Ispitaće se genotoksični efekat ekstrakata na neizmenjenim humanim HaCaT keratinocitima primjenom alkalnog komet testa. Ćelije će biti tretirane tokom 24 h subtoksičnim koncentracijama ekstrakata. Intenzitet oštećenja DNK, odnosno fragmentacija DNK biće

odreden primjenom SYBR gold boje i analizom kometa pod fluorescentnim mikroskopom primjenom softvera Comet Assay IV.

8. Test akutne toksičnosti u *in vivo* uslovima - Limit test

Osnovni princip Limit testa je da se životinjama daje jedna doza supstance (2000 mg/kg), a zatim se posmatraju eventualni toksični efekti. Ako se ne pojave ozbiljni toksični efekti, smatra se da je doza bezbjedna i da nema potrebe za daljim testiranjem u većim dozama. Limit test se koristi u situacijama kada se pretpostavlja da postoji široka bezbjednosna margina između očekivane doze i doze koja izaziva toksičnost. (U slučaju da "Limit test pokaže da je LD50 > 2.000 mg/kg, radi se "Main test").

9. Praćenje opšteg stanja životinja omogućava identifikaciju bilo kakvih nepoželjnih efekata supstance na zdravlje životinje. Pratiće se promjene na koži, krznu, očima ili sluzokožama, prisustvo sekreta i izlučevina, suženje, nakostriješenost, veličina zenica, respiratorni obrazac, promjene u hodu, držanju, odgovoru na rukovanje ili čudno ponašanje (samopovređivanje, hodanje unazad).

Takode, kao sastavni dio Limit testa pratiće se promjene težine životinja, unosa hrane i vode – ova zapažanja pružaju vitalne informacije o zdravstvenom stanju i potencijalnim toksičnim efektima ispitivane supstance i omogućavaju identifikaciju toksičnih efekata na ishranu, hidrataciju i metabolizam, čime se doprinosi sveobuhvatnoj procjeni bezbjednosti supstance.

Isto tako, velika nekropsija (Gross necropsy) – postupak detaljnog vizuelnog pregleda tijela životinje nakon smrti ukoliko nastane, kako bi se utvrdili vidljivi patološki ili anatomski nalazi. Ova procedura obuhvata opsežno ispitivanje organa i tkiva radi identifikacije promjena, oštećenja ili patoloških procesa koji bi mogli ukazivati na uzrok smrti ili opšte zdravstveno stanje životinje.

10. Statistička obrada i analiza dobijenih podataka. Za odgovarajuća ispitivanja bioloških aktivnosti koriste se odgovarajući softverski programi, koji čine paket testa. Nakon analize rezultata i zaključaka istraživanja u formi naučnog rada, u nekom od časopisa koji se bave tematikom bioloških i biomedicinskih istraživanja biće prezentovani rezultati rada.

Očekivani naučni doprinos

- Od rezultata ove disertacije se očekuje da doprinesu novim saznanjima u analizi hemijskog sastava antioksidativnih i drugih biološki aktivnih komponenti jer u do sada objavljenoj fitohemijskoj literaturi ne postoje noviji podaci o hemijskom sastavu i biološkim aktivnostima odabranih biljaka iz porodice Lamiaceae sa područja Crne Gore dobijenih pomoću ultrazvučne ekstrakcije. U naučnoj literaturi takode, nema podataka o antioksidativnoj, antimikrobnoj, anmutagenoj-antikancerogenoj aktivnosti, kao ni citotoksičnoj na ćelijskim linijama i *in vivo* istraživanja na eksperimentalnim životinjama. Pored toga, rezultati predložene disertacije treba da potvrde da su odabrani predstavnici koji pripadaju porodici Lamiaceae važan izvor za proizvodnju proizvoda sa ljekovitim svojstvima i primjenu u farmaceutskoj industriji. Identifikacijom i karakterizacijom hemijskih jedinjenja zastupljenih u navedenim predstavnicima porodice Lamiaceae doprinijeće se poznavanju hemijskog sastava aromatičnih biljaka sa područja Crne Gore.

- Ovo istraživanje će biti jedno od rijetkih koje će obuhvatiti veliki spektar i *in vivo* i *in vitro* testova na ispitivanom materijalu, kao i nekoliko različitih vrsta među kojima će se napraviti komparacija u biološkim efektima. Samim tim dobićemo raznovrstan i bogat skrining biološkog potencijala ispitivanog materijala, kao i hemijski profil.

- Rezultati testova bioloških aktivnosti (antimikrobne, antioksidativne i antikancerogene) ukazaće da li se navedene biljke ili njihovi produkti, mogu koristiti kao potencijalni agensi

(ljekovi) u liječenju i kontroli bakterijskih/gljivičnih infekcija, u borbi protiv oksidativnog stresa, kao i tretmana i prevencije različitih tipova kancera.

Nova saznanja o intezitetu citotoksičnog dejstva ekstrakata u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

- Nova saznanja o potencijalnom citoprotektivnom djelovanju ekstrakata prema ćelijama u stanju oksidativnog stresa.

Spisak objavljenih radova kandidata

Preljević, K., Pašić, I., Vlaović, M., Matić, I. Z., Krivokapić, S., Petrović, N., ... & Perović, S. (2024). Comparative analysis of chemical profiles, antioxidant, antibacterial, and anticancer effects of essential oils of two *Thymus* species from Montenegro. *Fitoterapia*, 105871.

Popis literature

1. Amor, I. L. B., Boubaker, J., Sgaier, M. B., Skandrani, I., Bhour, W., Neffati, A., ... & Chekir Ghedira, L. (2009). Phytochemistry and biological activities of *Phlomis* species. *Journal of ethnopharmacology*, 125(2), 183-202.
2. Bueno, J. M., Ramos-Escudero, F., Sácz-Plaza, P., Muñoz, A. M., José Navas, M., & Asucro, A. G. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews*
3. Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, D., Herak Ćustić, M., & Satović, Z. (2016). Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods – a review . *Czech Journal of Food Sciences*, 34(No. 5), 377–390. doi:10.17221/504/2015-cjfs
4. Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Fini, A., & Tatini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants under abiotic stresses. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability, 159-179.
5. Dzhambazov, B., Daskalova, S., Monteve, A., & Popov, N. (2002). In vitro screening for antitumour activity of *Clinopodium vulgare* L.(Lamiaceae) extracts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(4), 499-504.
6. Eghbaliferiz, S., Soheili, V., Tavarani Najaran, Z., & Asili, J. (2019). Antimicrobial and cytotoxic activity of extracts from *Salvia tebesana* Bunge and *Salvia sclareopsis* Bornm cultivated in Iran. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. doi:10.1007/s12298-019-00652-w
7. Kazemi, S., Soltanzadeh, H., & Shahsavari, G. (2021). The Study of Anticancer Activity of *Satureja Khuzestanica* Alcoholic Extracts On Expression of Bcl2 And Bax Genes In The Pc3 Cell Line.
8. Mandura Jarić, A., Ćikoš, A., Pocrnić, M., Aladić, K., Jokić, S., Šeremet, D., ... & Komes, D. (2023). *Teucrium montanum* L.—Unrecognized Source of Phenylethanoid Glycosides: Green Extraction Approach and Elucidation of Phenolic Compounds via NMR and UHPLC-ESI/MS/MS. *Antioxidants*, 12(11), 1903.
9. Marin, P. D., Veitch, N. C., Grayer, R. J., Kite, G. C., Soković, M., & Janačković, P. (2007). Flavonoids from *Phlomis fruticosa* (Lamiaceae) growing in Montenegro. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(7), 462–466. doi:10.1016/j.bse.2007.01.001
10. Ramos da Silva, L. R., Ferreira, O. O., Cruz, J. N., de Jesus Pereira Franco, C., Oliveira dos Anjos, T., Cascaes, M. M., ... & Santana de Oliveira, M. (2021). Lamiaceae essential oils, phytochemical profile, antioxidant, and biological activities. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021.
11. Vladić, J., Čebović, T., Vidović, S., & Jokić, S. (2020). Evaluation of Anticancer Activity of *Satureja montana* Supercritical and Spray-Dried Extracts on Ehrlich's Ascites Carcinoma Bearing Mice. *Plants*, 9(11), 1532. doi:10.3390/plants9111532
12. Vuković, N., Milosević, T., Sukdolac, S., & Solujic, S. (2008). The chemical composition of the essential oil and the antibacterial activities of the essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(3).

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM		
Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.		
Prvi mentor	dr Svetlana Perović, red. prof.	<i>S. Perovic</i>
Drugi mentor		
Doktorand	MSc Kenan Preljević	<i>Kenan Preljevic</i>
IZJAVA		
Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.		
U Podgorici, 25.06.2024.		
Ime i prezime doktoranda <i>Kenan Preljevic</i>		

Komisiji Prirodno-matematičkog fakulteta za doktorske studije

Predlažem Vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta da imenuje Komisiju za ocjenu prijave teme doktorske disertacije pod nazivom “*In vitro* i *in vivo* istraživanje biološke aktivnosti i hemijske karakterizacije ekstrakata iz familije *Lamiaceae* sa područja Crne Gore” kandidata Kenana Preljevića, u sastavu:

1. Prof. dr Svetlana Perović, mentor
2. Prof. dr Slađana Krivokapić, član
3. Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, član

U Podgorici, 05.07.2024.

Prof. dr Svetlana Perović