

**НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА**

КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ - ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Предмет: Извештај Комисије за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидата магистра фармације - медицинског биохемичара Тијане Илић

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета бр. 2735/2, донетој на седници Већа одржаној 21.11.2024. год. именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата маг. фарм. мед. биохем. Тијане Илић, под називом:

„Хемијски састав и биолошка активност плодова *Lycium barbarum* L. и *Lycium ruthenicum* Murr. (Solanaceae) гајених у Србији“

Ментор:

Др сц. Бојана Видовић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
Ужа научна област: Броматологија

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:

1. Др сц. Мирјана Марчетић - председник Комисије, ванредни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет. Ужа научна област: Фармакогнозија
2. Др сц. Драгана Божић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет. Ужа научна област: Микробиологија са имунологијом и имунохемијом
3. Др сц. Јелена Ђуриш, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет. Ужа научна област: Фармацеутска технологија
4. Др сц. Брижита Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет. Ужа научна област: Броматологија
5. Др сц. Гордана Здунић, научни саветник, Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“. Ужа научна област: Биотехнологија

прегледала је приложену докторску дисертацију и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета следећи извештај.

ИЗВЕШТАЈ

1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација маг. фарм. мед. биохем. Тијане Илић, под називом: „Хемијски састав и биолошка активност плодова *Lycium barbarum* L. и *Lycium ruthenicum* Murr. (Solanaceae) гајених у Србији“, састоји се из 6 поглавља: Увод, Циљеви истраживања, Експериментални део, Резултати и дискусија, Закључак, Литература. На почетку дисертације приложен је сажетак на српском и енглеском језику, а на крају кратка биографија кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истовестности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације.

Докторска дисертација је написана на 136 стране, латиничним писмом, фонтом *Times New Roman*, величине 12, и са једноструким проредом. Подељена је у следећа поглавља: Увод (27 страна), Циљеви истраживања (1 страна), Експериментални део (29 страна), Резултати и дискусија (56 страна), Закључак (4 стране), Литература (19 страна). Дисертација садржи укупно 42 слике (12 у Уводу, 11 у Експерименталном делу и 19 у Резултатима и дискусији), 41 табеле (1 у Уводу, 7 у Експерименталном делу и 33 у Резултатима и дискусији) и 310 литературна навода.

На почетку поглавља Увод су описане опште ботаничке карактеристике и распрострањеност биљака фамилије Solanaceae и рода *Lycium*, са посебним освртом на највише проучаване врсте *Lycium barbarum* L. и *L. ruthenicum* Murr. У наставку је кратко описана употреба плодова врста рода *Lycium*, познатих под називом гоци, у традиционалној медицини и исхрани становника азијских земаља, као и подаци о њиховој заступљености на глобалном тржишту. Додатно, дат је осврт на различите производе на бази плодова гоци, као и на потенцијални значај споредних производа прераде плодова гоци. У наставку су описане нутритивне карактеристике плодова *L. barbarum* и *L. ruthenicum* и дат је преглед њихових најзначајнијих биолошки активних састојака: полисахарида, каротеноида, фенолних једињења и алкалоида. Такође, представљен је преглед биолошких активности плодова *L. barbarum* и *L. ruthenicum*, као и литературних података о њиховим позитивним и негативним здравственим ефектима. На крају Увода дат је осврт на значај савремених методологија у оптимизацији екстракције биоактивних једињења, са посебним нагласком на експерименталне дизајне, као што су *Plackett-Burman* и *Vox-Behnken*, који омогућавају прецизно моделирање и оптимизацију услова екстракције.

Циљеви истраживања су јасно дефинисани и обухватају процену хемијског састава и биолошке активности плодова врста рода *Lycium* гајених у Србији, као и споредних производа који настају током њихове прераде. Први циљ је испитивање хемијских и нутритивних карактеристика свежих и/или лиофилизованих плодова врста *L. barbarum* и *L. ruthenicum* гајених у Србији. Други део истраживања је имао за циљ процену *in vitro* биолошких активности испитиваних врста кроз испитивање антиоксидативне, антиензимске, антимикробне и пребиотске активности воденометанолних екстраката плодова гоци. Трећи део истраживања за циљ је имао оптимизацију процеса екстракције одабраних биоактивних састојака из плодова *L. barbarum*, као и биолошку карактеризацију добијених екстраката. Четврти део истраживања је имао за циљ анализу хемијског састава, оптимизацију процеса екстракције и процену биолошких активности споредних производа прераде плодова *L. barbarum*, након цеђења сока (пулпа) и након цеђења уља из семена (погача).

Поглавље *Експериментални део* обухвата детаљан опис коришћене методологије и подељено је у следећа потпоглавља: 1) Хемикалије, реагенси и стандарди; 2) Материјал; 3) Анализа хемијског састава плодова гоци; 4) Анализа физичко-хемијског састава плодова гоци; 5) Анализа биоактивних једињења у плодовима гоци; 6) Анализа биолошких активности плодова гоци; 7) Оптимизација процеса екстракције; 8) Статистичка анализа.

Плодови *L. barbarum*, *L. barbarum* var. *auraticarpum*, и *L. ruthenicum* су сакупљени у фази зрелости са приватне плантаже у Нишу. Такође, анализирани су и плодови *L. barbarum* прикупљени са других плантажа у Србији, као и споредни производи прераде плодова *L. barbarum*, пулпа и погача, добијени од произвођача гоци сока и уља. Подаци о анализираним плодовима, поступцима припреме узорака и екстраката су детаљно описани.

Анализа хемијских и нутритивних карактеристика свежих и/или лиофилизованих гоци плодова, обухватила је одређивање садржаја влаге, пепела, укупних протеина, укупних масти, као и укупних, растворних и нерастворних дијетних влакана применом АОАС (енгл. *Association of Official Analytical Chemists*) метода, док је енергетска вредност израчуната рачунским путем. Масно-киселински састав је одређен методом гасне хроматографије са пламено-јонизационим детектором (*GC-FID*), фитостерола применом методом гасне хроматографије са пламено-јонизационом и масеним детектором (*GC-FID/MSD*), док је садржај 2-*O*- β -*D*-глукопиранозил-*L*-аскорбинске киселине (*AA-2 β G*) одређен применом високо-ефикасне течне хроматографије са детектором са диодним низом (*HPLC-DAD*). Садржај макроелемената је одређен методом индуктивно спрегнуте плазма оптичке емисионе спектрометрије (*ICP-OES*), а микроелемената методом масене спектрометрије са индуктивно куплованом плазмом (*ICP-MS*). Од физичко-хемијских параметара одређивана је *pH* вредност, садржај растворљиве суве материје и титрирана киселост. Одређивање укупних полисахарида, каротеноида, полифенола, флавоноида, антоцијана и танина је одређено спектрофотометријским методама, док је анализа полифенолних једињења извршена применом *HPLC-DAD* и течне хроматографије са масеном спектрометријом (*LC-MS*), за које су детаљно описани услови извођења.

Антиоксидативни потенцијал екстраката свежих и/или лиофилизованих гоци плодова, као и споредних производа прераде плодова гоци, процењиван је применом *in vitro* метода. За процену антирадикалске активности коришћени су тестови неутрализације *DPPH* и *ABTS*^{•+} радикала, за процену редукционих способности анализираних екстраката коришћени су *FRAP* и *CUPRAC* тестови, док је за процену инхибиције липидне пероксидације коришћена метода одређивања способности инхибиције обезбојавања β -каротена. У циљу свеобухватне процене антиоксидативне активности екстраката, као и њихове компаративне анализе, израчунате су вредности антиоксидативног композитног индекса.

Антиензимска активност анализирана је кроз *in vitro* инхибицију ензима α -амилазе, α -глукозидазе, тирозиназе и ацетилхолинестеразе. Добијени резултати су поређени са позитивним контролама: акарбозом, галантамином и којичном киселином. Додатно, за воденометанолни екстракт плода *L. ruthenicum* испитивана је способност инхибиције ензима 15-липооксигеназе.

Антимикробне активности екстракта свежих и/или лиофилизованих гоци плодова одређене су *in vitro* бујон-микродилуционом методом, одређивањем минималне инхибиторне концентрације, на три Грам-позитивне бактерије: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) и *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); четири Грам-негативне бактерије *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (NCIMB 8267), *Salmonella enterica* (NCTC 6017) и *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) и гљивицу *Candida albicans* (ATCC 24433). Добијени резултати упоређивани су са референтним антибиотицима, који су коришћени као позитивна контрола: амикацин, колистин, ципрофлоксацин и антимиотик флуконазол.

Пребиотска активност воденометанолног екстракта плода *L. ruthenicum* одређивана је кроз утицај различитих концентрација екстракта на раст четири пробиотска соја Грам-позитивних бактерија: *Lactobacillus plantarum* Lp 299v, *Limosilactobacillus reuteri* Protectis (DSM 17938), *Lactobacillus rhamnosus* GG и *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ST-21; два соја гљивице *Saccharomyces boulardii*, као и две комбинације пробиотских сојева: *Lactobacillus helveticus*, *L. rhamnosus* и *Bifidobacterium longum* (MIX1) и њихову комбинацију са *Saccharomyces boulardii* (MIX2). Добијени резултати су изражени као проценат стимулације раста у присуству екстракта, у поређењу са контролним групама (број микроорганизама који су култивисани само у одговарајућој хранљивој подлози).

Оптимизација процеса екстракције одабраних биоактивних једињења из лиофилизованих плодова гоци и споредних производа прераде плодова гоци спроведена је применом *Plackett-Burman* и *Box-Behnken* експерименталних дизајна. Применом *Plackett-Burman* дизајна анализирани су параметри (температура, време, однос између дроге и растварача, третман ултразвуком, концентрација етанола, мешање и претходна мацерација или величина честица) за које је очекивано да могу имати утицај на процес екстракције. Након тога, фактори који су показали најзначајнији утицај на екстракцију су оптимизовани применом методологије површине одговора, коришћењем *Box-Behnken*-овог дизајна.

Поглавље *Резултати и дискусија* обухвата четири целине, у складу са претходно дефинисаним циљевима истраживања. Резултати у овом поглављу су приказани кроз 33 табеле и 19 слика, на јасан и прегледан начин. Добијени резултати су упоређени са релевантним литературним подацима, уз одговарајућа објашњења и изнета запажања и тумачења кандидата.

У поглављу *Закључак* су таксативно наведени основни закључци који произилазе из добијених резултата истраживања, према претходно дефинисаним циљевима и фазама истраживања, док је на крају поглавља представљен општи закључак који интегрише добијене резултате и истиче њихов значај.

Литература обухвата списак референци (310) које су коришћене у оквиру ове докторске дисертације.

2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У оквиру прве фазе истраживања извршена је анализа хемијског састава свежих плодова *L. barbarum*, *L. barbarum* var. *auraticarpum* и *L. ruthenicum* прикупљених са исте плантаже у јужној Србији. Такође, извршена је компаративна анализа хемијског састава

лиофилизированих плодова *L. barbarum* прикупљених са шест плантажа из различитих региона Србије. Поред одређивања основних нутритивних параметара и енергетске вредности, извршена је анализа физичко-хемијских параметара, као и хемијска карактеризација у погледу садржаја минералних материја, масних киселина, фитостерола, провитамина витамина Ц (AA-2 β G), као и садржаја укупних полисахарида, укупних каротеноида и полифенолних једињења. Свежи плодови *L. barbarum* су имали значајно већи садржај укупних масти (1,15%) и доступних угљених хидрата (16,9%), док се садржаји укупних протеина и укупног пепела нису значајно разликовали међу плодовима различитих *Lycium* врста. Енергетска вредност свежих плодова *L. ruthenicum* (246 kJ/100 g) је била за 38 % нижа од плодова *L. barbarum* (394 kJ/100 g) и за око 30 % нижа од плодова *L. barbarum* var. *aurauticarpum* (353 kJ/100 g). Садржај укупних дијетних влакана је био сличан у свежим плодовима *L. barbarum* и *L. barbarum* var. *aurauticarpum* и значајно је био већи од садржаја у свежим плодовима *L. ruthenicum*. Садржај калцијума и гвожђа у плодовима *L. barbarum* је био око два пута већи у односу на плодове *L. barbarum* var. *aurauticarpum*. Осим натријума и калцијума, садржај минерала у плодовима *L. ruthenicum* је био нижи у поређењу са плодовима *L. barbarum* и *L. barbarum* var. *aurauticarpum*. Најзаступљеније масне киселине у анализираним свежим плодовима гоци су биле линолна, олеинска, палмитинска и стеаринска киселина, које су чиниле око 95 % од укупних масних киселина. Плодови *L. ruthenicum* су имали највећи садржај засићених масних киселина, док су плодови *L. barbarum* var. *aurauticarpum* имали највећи садржај полинезасићених масних киселина. У свежим плодовима *L. barbarum* одређен је већи садржај AA-2 β G (33,4 mg/100 g) у односу на свеже плодове *L. barbarum* var. *aurauticarpum* (24,2 mg/100 g), док његово присуство није утврђено у плодовима *L. ruthenicum*. Највећи садржај укупних полифенола (295,7 mg GAE/100 g) и укупних танина (0,63 mg PYE/100g) одређен је у плодовима *L. ruthenicum*, док је највећи садржај укупних флавоноида одређен у плодовима *L. barbarum* var. *aurauticarpum* (335,5 mg HE/100 g). Антоцијани су једино одређени у плодовима *L. ruthenicum* (196 mg C3G/100 g). У метанолном екстракту лиофилизованог плода *L. ruthenicum* идентификовано је присуство шест гликозида антоцијана, укључујући делфинидин, малвидин и четири деривата петунидина, као и хлорогенске и дикафеоилхининске киселине.

Утврђене су значајне разлике у нутритивном саставу и садржају биоактивних једињења између лиофилизированих плодова *L. barbarum* прикупљених на различитим плантажама. У лиофилизированим плодовима *L. barbarum* идентификовано је и квантификовано десет фитостерола, од којих су најзаступљенији били β -ситостерол (18–26 %), Δ 5-авенастерол (15–20 %) и 24-метилдесмостерол (13–17 %). Такође, у воденометанолним екстрактима лиофилизированих плодова *L. barbarum* утврђено је присуство укупно седам фенолних једињења. Најзаступљеније фенолкарбоксилне киселине су биле хлорогенска и гална, док је присуство ферулинске киселине, кемферола и кверцетина утврђено само у неким од анализираних узорака.

У другој фази истраживања извршена је анализа *in vitro* биолошких активности воденометанолних екстраката свежих и/или лиофилизированих гоци плодова. Антиоксидативна активност је процењена на основу испитивања антирадикалске и редукционе способности, као и испитивањем инхибиторног утицаја на липидну пероксидацију. Воденометанолни екстракти плодова *L. ruthenicum* су показали најизраженију редукциону активност и антирадикалску активност, док је за екстракте плодова *L. barbarum* и *L. barbarum* var. *aurauticarpum* утврђен већи капацитет

инхибиције липидне пероксидације. Антиоксидативни композитни индекс за воденометанолни екстракт плодова *L. ruthenicum* је био око 1,7 пута већи у односу на воденометанолне екстракте плодова *L. barbarum* и *L. barbarum* var. *auraticarpum*. Утврђене су статистички значајне разлике у антиоксидативној активности воденометанолних екстраката лиофилизованих плодова *L. barbarum* са различитих плантажа. Екстракти који су имали највећи садржај укупних полифенола и у којима је утврђено присуство хлорогенске киселине, кафеине киселине и деривата кверцетина, показали су најизраженије антиоксидативне ефекте. Воденометанолни екстракти лиофилизованих плодова *L. barbarum* су показали око два пута израженији инхибиторни потенцијал према α -амилази (IC_{50} је био у распону од 1,68 до 2,83 mg/mL) у поређењу са α -глукозидазом (IC_{50} је био у распону између 5,32 до 6,88 mg/mL) али слабије ефекте у поређењу са акарбозом за коју су IC_{50} вредности износиле 5,27 μ g/mL за α -амилазу и 110 μ g/mL за α -глукозидазу. Сви екстракти су показали инхибицију тирозиназне активности (IC_{50} = 3,96 - 4,85 mg/mL) и ацетилхолинестеразне активности (IC_{50} = 4,84 - 6,20 mg/mL), али слабију у односу на којичну киселину (IC_{50} = 16,43 μ g/mL) и галантамин (IC_{50} = 0,45 μ g/mL), као позитивне контроле. Најизраженија антимикуробна активност утврђена је за воденометанолни екстракт плодова *L. barbarum* var. *auraticarpum*, који је у концентрацији од 2 mg/mL инхибирао раст три Грам-негативне бактерије (*S. pneumoniae*, *S. aboni* и *P. aeruginosa*), као и гљивицу *C. albicans*. За разлику од воденометанолних екстраката плодова *L. barbarum* и *L. barbarum* var. *auraticarpum*, екстракт плодова *L. ruthenicum*, који је богат антоцијанима, није показао инхибиторни ефекат на раст микроорганизама, у испитиваним концентрацијама (0,125–2 mg/mL). Воденометанолни екстракт плодова *L. ruthenicum* у опсегу 0,3-5,0 mg/mL, на дозно-зависан начин промовисао је раст пробиотских сојева микроорганизама, у распону од 111,4 % до 229,2 % у односу на контролу. Посебно изражен пребиотски потенцијал је утврђен на раст *Saccharomyces boulardii*, чији раст је стимулисан 2,8 пута у поређењу са контролом.

У оквиру треће фазе истраживања извршена је оптимизација екстракције садржаја биоактивних једињења из лиофилизованих плодова *L. barbarum*. Применом *Plackett-Burman* дизајна идентификовани су кључни параметри екстракције: време, однос дрога/растварач и концентрација етанола, чији утицај је даље оптимизован коришћењем централног композитног дизајна и анализом методологије површине одговора. Дефинисани су услови екстракције под којим се постиже максимална екстракција укупних полифенола и укупних флавоноида: 60% етанол, однос дрога/раствор 1:60 (*m/v*) и време екстракције од 30 минута. Екстракти припремљени под дефинисаним условима, уз претходну мацерацију од 30 минута на константној температури од 40°C уз континуирано мешање, показали су израженију антиоксидативну и антиензимску активност у поређењу са екстрактима из претходне фазе истраживања, што указује на адекватност модела екстракције.

У оквиру четврте фазе истраживања извршена је анализа хемијског састава, испитивање антиоксидативне и антиензимске активности споредних производа прераде плодова *L. barbarum* (пулпа и погача), као и оптимизација екстракције њихових биоактивних једињења. Утврђене су значајне разлике у нутритивном саставу и садржају биоактивних једињења између споредних производа прераде плодова гоци. Садржај укупног пепела, који указује на садржај минерала, значајно је био већи у пулпи (5,05 %), него у погачи (2,93 %). Укупни садржај масти у погачи (13,3 %) је био око 3,5 пута већи него у пулпи (3,82 %). Садржај укупних протеина у пулпи је износио 16,8 %, док је у

погачи био 19,6 %. На основу садржаја влакана, и пулпа (51,17 %) и погача (59,84 %) представљају „богате изворе влакана“. Већи садржај укупних полифенола и укупних полисахарида одређен је у екстрактима пулпе у поређењу са екстрактима погаче. Екстракти пулпе су показали израженију антиоксидативну и антиензимску активност у поређењу са екстрактима погаче. Применом *Plackett-Burman* дизајна идентификовани су кључни параметри екстракције, чији утицај је потом оптимизован коришћењем централног композитног дизајна и анализом методологије површине одговора. Дефинисани су услови екстракције под којим се постиже максимална екстракција укупних полифенола и антиоксидативна активност: 60% етанол, однос дрога/раствор 1:60 (*m/v*) и време екстракције од 30 минута. Анти-тирозилазна активност екстракта пулпе добијена под оптимизованим условима екстракције ($IC_{50} = 2,77 \text{ mg/mL}$) је била око три пута израженија у односу на воденометанолни екстракт пулпе ($IC_{50} = 8,89 \text{ mg/mL}$).

3. УПОРЕДНА АНАЛИЗА СА РЕЗУЛТАТИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Род *Lucium* обухвата око 100 биљних врста, које су распрострањене углавном у сушним и полусушним регионима Северне и Јужне Америке, Африке и Евроазије (1). Најпознатије и највише испитиване врсте су *Lucium chinense* Mill. и *L. barbarum* (2), а последњих година, све већи број истраживања је усмерен ка испитивању и других врста рода *Lucium*, укључујући *L. ruthenicum* (3). Плодови *Lucium* врста, су овалне, 1-2 cm дугачке бобице, различитих боја, са бројним семенима. *L. barbarum* плодови су наранџастоцрвени, *L. barbarum* var. *auraticarpum* су жуте боје, док су плодови *L. ruthenicum* тамнољубичасте боје (4, 5). Осим примене у традиционалној медицини становника Кине и других азијских земаља, плод гоџи и његови производи се данас користе у исхрани широм света, при чему се због биолошких активности и позитивних здравствених ефеката означавају као функционалне намирнице, “супер-храна” и сл (6). До сада је из плодова гоџи изоловано и идентификовано више од 350 хемијских једињења (7). Међутим, хемијски састав плодова гоџи се може значајно разликовати у зависности од географског порекла, начина узгоја и климатских услова. Међутим нема много података о хемијском саставу и биолошкој активности плодова врста *Lucium* који се узгајају у Србији (8). Хемијски састав и биолошка активност плодова *L. barbarum* var. *auraticarpum* и *L. ruthenicum* гајених у Србији су испитани по први пут у оквиру ове докторске дисертације.

Свежи плодови гоџи садрже велику количину воде и мали садржај масти, што доприноси релативно ниској енергетској вредности. Основни нутритивни састав анализираних свежих плодова *L. barbarum*, *L. barbarum* var. *auraticarpum* и *L. ruthenicum* је у складу са литературним подацима (9-11). Резултати потврђују да плод гоџи представља значајан извор дијетних влакана, са односом растворних и нерастворних влакана око 3:1 (11). Најзаступљеније масне киселине у анализираним плодовима гоџи су линолна, олеинска, палмитинска и стеаринска киселина. Ове масне киселине чине око 95 % од укупних масних киселина. Слични састави масних киселина су утврђени за плодове *L. barbarum* у Италији (10, 12), Грчкој (13), Турској (14), Северној Македонији (15), као и за плодове *L. ruthenicum* пореклом из Кине (16). Међутим, нема литературних података о саставу масних киселина у плодовима *L. barbarum* var. *auraticarpum*. Упркос сличном квалитативном саставу утврђене су значајне квантитативне разлике у садржају масних киселина између различитих плодова гоџи. Липидни индекси утврђени за плодове *L. barbarum* у овом истраживању су у складу са

литературним подацима за гоци плодове из Италије (10), али су повољнији у поређењу са плодовима гоци из Грчке (13) и Бразила (17). Најзаступљенији фитостероли у плодовима *L. barbarum* су били β -ситостерол (18–26 %), $\Delta 5$ -авенастерол (15–20%) и 24-метилдесмостерол (13–17%). У другим истраживањима је показано да је β -ситостерол био најзаступљенији фитостерол у плодовима гоци пореклом из Италије (10, 12), док су плодови гоци из Кине и Монголије садржали веће количине $\Delta 5$ -авенастерола и $\Delta 5,23$ -стигмастидиенола (12). За разлику од претходних истраживања у плодовима *L. barbarum* из Србије утврђено је присуство 24-метилдесмостерола, што може бити од потенцијалног значаја за идентификацију плодова *L. barbarum* пореклом из Србије. Резултати испитивања минералног састава указују да садржај варира не само између плодова различитих врста *Lycium*, већ између плодова *L. barbarum* са различитих локалитета, што се може објаснити разликама у садржају минерала у земљишту и примењеним агротехничким мерама (14,18). У плодовима гоци одређен је *AA-2 β G*, стабилан дериват витамина Ц, који има провитаминску активност. Садржај *AA-2 β G* је био у распону од 11,8 до 80,3 mg/100 g, што је упоредиво са литературним подацима за плодове *L. barbarum* пореклом из Швајцарске (40-279 mg/100g) (19), али значајно више у односу на садржај *AA-2 β G* у плодовима *L. barbarum* пореклом из Пољске (2,39-6,24 mg/100g) (20).

Садржај укупних каротеноида је био значајно већи у плодовима *L. barbarum* у поређењу са плодовима *L. barbarum* var. *auraticarpum*, док њихово присуство у плодовима *L. ruthenicum* није утврђено. Ови резултати су у складу са литературним подацима који указују на разлике у садржају између плодова различитих *Lycium* врста (21, 22). У поређењу са литературним подацима, просечан садржај укупних каротеноида у лиофилизованим плодовима *L. barbarum* (7,85 mg/g) је већи у поређењу са литературним подацима (20, 23). Просечан садржај укупних полисахарида у анализираним узорцима плодова *L. barbarum* у овом истраживању (248 mg Glu/g) је у складу са литературним подацима за плодове гоци пореклом из Северне Македоније (212-370 mg/g) (15), нижи је у поређењу са плодовима гоци пореклом из Грчке (370-490 mg/g) (13), а већи у односу на плодове гоци пореклом из Кине (23,62-42,45 mg/g) (24). Познато је да се укупни садржај полифенола значајно разликује између плодова различитих *Lycium* врста (25). Додатно, уочене разлике у садржају укупних полифенола у плодовима *L. barbarum* у односу на литературне податке, могу се објаснити различитим климатским условима, карактеристикама земљишта (26), као и примењеним методама екстракције (27, 28). У погледу полифенолног састава у плодовима *L. barbarum* најзаступљеније фенолкарбоксилне киселине су биле хлорогенска и гална, док су ферулинска киселина, кемферол, кверцетин и рутин детектовани само у неким узорцима. У претходним истраживањима, кверцетин-3-*O*-рутинозид и *p*-кумаринска киселина су били најзаступљенија полифенолна једињења у плодовима *L. barbarum* пореклом из Португала (29), док су ферулинска киселина и рутин били најзаступљенији у плодовима *L. barbarum* пореклом из Швајцарске (19). Петунидин је био најзаступљенији антоцијан у екстракту плодова *L. ruthenicum*, док је делфинидин био присутан у траговима. Ови резултати су у складу са профилем антоцијана за плодове *L. ruthenicum* пореклом из Кине (21) и из Северне Македоније (30).

У погледу антиоксидативне активности, показано је да воденометанолни екстракти плодова *L. ruthenicum* имају израженију антиоксидативну активност у поређењу са воденометанолним екстрактима плодова *L. barbarum* и *L. barbarum* var. *auraticarpum*. Овај резултат је у складу са литературним подацима о разликама између

антиоксидативног потенцијала плодова *L. ruthenicum* у поређењу са плодовима *L. barbarum* (28,31). Статистички значајне разлике у антиоксидативном потенцијалу воденометанолних екстраката плодова *L. barbarum* са различитих локалитета се могу објаснити утврђеним разликама у њиховом полифенолном саставу (13, 20, 34). Сви анализирани екстракти плодова гоци су показали инхибиторну ензимску активност али слабију у односу на позитивне контроле, што је у складу са претходним истраживањима (20, 32). Најизраженија антимикуробна активност утврђена је за екстракт плодова *L. barbarum* var. *aurauticarpum* (MIC 2 mg/mL). Претходно истраживање је показало да метанолни екстракт плодова *L. barbarum* инхибира раст Грам-позитивних (MIC 2,5–5 mg/mL) и Грам-негативних бактерија (MIC 2,5–20 mg/mL) (29). Израженији антимикуробни потенцијал екстракта плодова *L. barbarum* var. *aurauticarpum* у односу на екстракте плодова *L. barbarum* и *L. ruthenicum* може се приписати већем садржају укупних флавоноида (35). Благи до умерени антимикуробни потенцијал воденометанолних екстраката плодова *L. barbarum* се може приписати биоактивним једињењима, попут фенолкарбоксилних киселина. Сматра се да ови биоактивни састојци интерагују са протеинима, нарушавају интегритет мембрана микроорганизама и инхибирају њихове есенцијалне ензиме (33). Супротно екстрактима плодова *L. barbarum* и *L. barbarum* var. *aurauticarpum*, екстракт плодова *L. ruthenicum*, који је богат антоцијанима, није показао инхибиторни ефекат на раст микроорганизама, у испитиваним концентрацијама (0,125–2 mg/mL). Метанолни екстракт плодова *L. ruthenicum* стимулисао је раст пробиотских сојева микроорганизама, посебно *Saccharomyces boulardii*, чији раст је стимулисан 2,8 пута у поређењу са контролом. Утврђени пребиотски ефекти екстраката плодова LR могу се приписати антоцијанима. Литературни подаци указују да антоцијани не подлежу дигестији у интестиналном тракту, већ ферментишу до краткочланчаних масних киселина које ступају у интеракцију са цревном микробиотом (36) и доприносе антиинфламаторним ефектима у гастроинтестиналном тракту (37).

Екстракти добијени из лиофилизованих плодова *L. barbarum* под оптимизованим условима екстракције су показали бољу антиоксидативну и антиензимску активност. Претходно истраживање оптимизације екстракције биоактивних једињења из плодова *L. barbarum* показала су да продужење времена екстракције са 10 на 30 минута повећава принос екстракције. Међутим, даље продужење времена екстракције доводи до смањења приноса екстракције, што се може објаснити хидролизом и делимичном деградацијом биоактивних једињења (38).

Разлике у хемијској саставу и биолошкој активности споредних производа прераде плодова *L. barbarum*, пулпе и погаче, су генерално упоредиви са подацима из претходних студија за споредне производе прераде воћа и указују на њихов потенцијалну примену у прехранбеној и фармацеутској индустрији (39). Резултати и специфична запажања током четврте фазе истраживања нису могла бити директно упоређена са литературним подацима и сматрају се оригиналним доприносом истраживачког рада кандидата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yao R, Heinrich M, Weckerle CS. The genus *Lycium* as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review. *J Ethnopharmacol.* 2018; 212:50–66.
2. Yao R, Heinrich M, Zhao X, Wang Q, Wei J, Xiao P. What's the choice for goji: *Lycium barbarum* L. or *L. chinense* Mill.?. *J Ethnopharmacol.* 2021; 276:114185.
3. Han L J, Ye Y, Suo YR. The resource and economic value of *Lycium ruthenicum* Murray. *Chinese Wild Plant Resources* 2014; 33: 55–57.
4. Brinckmann JA. Herb Profile: *Lycium* Fruit. Market Insider for. Medicinal Plants & Natural Ingredients 2014:42-44.
5. Chen J, Chao CT, Wei X. Gojiberry breeding: current status and future prospects. In: Soneji JR, Nageswara-Rao M, editors. Breeding and health benefits of fruit and nut crops. IntechOpen; London, UK: 2018.
6. Shahrajabian MH, Sun W, Cheng Q. A review of goji berry (*Lycium barbarum*) in traditional Chinese medicine as a promising organic superfood and superfruit in modern industry. *Academia J Med Plants* 2018; 6(12): 437-445.
7. Qian D, Zhao Y, Yang G, Huang L. Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules.* 2017 Jun 8;22(6):911. Vulić JJ, Čanadanović-Brunet JM, Četković GS, Djilas SM, Tumbas Šaponjac VT, Stajčić SS. Bioactive compounds and antioxidant properties of goji fruits (*Lycium barbarum* L.) cultivated in Serbia. *J. Am. Coll. Nutr.* 2016, 35: 692–698.
8. Kulaitienė J, Vaitkevičienė N, Jarienė E, Černiauskienė J, Jeznach M, Paulauskienė A. Concentrations of minerals, soluble solids, vitamin C, carotenoids and toxigenic elements in organic goji berries (*Lycium barbarum* L.) cultivated in Lithuania. *Biol. Agric. Hortic.* 2020;36:130–140.
9. Montesano D, Rocchetti G, Cossignani L, Lucini L, Simonetti MS, Blasia F. Italian *Lycium barbarum* L. berry: Chemical characterization and nutraceutical value. *Nat Prod Commun.* 2018;13(9):1934578X1801300
10. Niro S, Fratianni A, Panfili G, Falasca L, Cinquanta L, Alam MR. Nutritional evaluation of fresh and dried goji berries cultivated in Italy. *Ital J Food Sci.* 2017; 29: 398–408.
11. Cossignani L, Blasi F, Simonetti MS, Montesano D. Fatty acids and phytosterols to discriminate geographic origin of *Lycium barbarum* berry. *Food Anal Methods.* 2018;11(4):1180–8.
12. Skenderidis P, Lampakis D, Giavasis I, Leontopoulos S, Petrotos K, Hadjichristodoulou C, et al. Chemical properties, fatty-acid composition, and antioxidant activity of goji berry (*Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill.) fruits. *Antioxidants.* 2019;8(3):60.
13. Endes Z, Uslu N, Özcan M, Er F. Physico-chemical properties, fatty acid composition and mineral contents of goji berry (*Lycium barbarum* L.) fruit. *J Agroalimnt Processes Technol.* 2015;21(1):36–40.
14. Covaci E, Senila M, Leopold LF, Olah NK, Cobzac C, Ivanova-Petropulos V, et al. Characterization of *Lycium barbarum* L. berry cultivated in North Macedonia: A chemometric approach. *J Berry Res.* 2020;10(2):223–41.
15. Yossa Nzeuwa IB, Guo B, Zhang T, Wang L, Ji Q, Xia H, et al. Comparative metabolic profiling of *Lycium* fruits (*Lycium barbarum* and *Lycium chinense*) from different areas in China and from Nepal. *J Food Qual.* 2019;2019:1–6.
16. Pedro AC, Pérez-Rodríguez ML, Sánchez-Mata MC, Bisinella RZ, De Oliveira CS, Schnitzler E, et al. Biological activities, chromatographic profile and thermal stability of organic and conventional goji berry. *J Food Meas Charact.* 2022;16(2):1263–73.

17. Liu Z, Liu B, Wen H, Tao Y, Shao Y. Phytochemical profiles, nutritional constituents and antioxidant activity of black wolfberry (*Lycium ruthenicum* Murr.). *Ind Crops Prod.* 2020;154:112692.
18. Kosińska-Cagnazzo A, Weber B, Chablais R, Vouillamoz JF, Molnár B, Crovadore J, et al. Bioactive compound profile and antioxidant activity of fruits from six goji cultivars cultivated in Switzerland. *J Berry Res.* 2017;7(1):43–59.
19. Wojdyło A, Nowicka P, Bąbalewski P. Phenolic and carotenoid profile of new goji cultivars and their anti-hyperglycemic, anti-aging and antioxidant properties. *J Funct Foods.* 2018;48:632–42.
20. Zhang Q, Chen W, Zhao J, Xi W. Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes. *Food Chem.* 2016 Jun;200:230–6.
21. Peng Y, Ma C, Li Y, Leung KSY, Jiang ZH, Zhao Z. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium* Fruits (*Fructus Lycii*). *Plant Foods Hum Nutr.* 2005;60(4):161–4.
22. Bertoldi D, Cossignani L, Blasi F, Perini M, Barbero A, Pianezze S, et al. Characterisation and geographical traceability of Italian goji berries. *Food Chem.* 2019 ;275:585–93
23. Lu Y, Guo S, Zhang F, Yan H, Qian DW, Wang HQ, et al. Comparison of functional components and antioxidant activity of *Lycium barbarum* L. fruits from different regions in China. *Molecules.* 2019;24(12):2228
24. Yao R, Heinrich M, Zou Y, Reich E, Zhang X, Chen Y, et al. Quality variation of goji (fruits of *Lycium* spp.) in China: A comparative morphological and metabolomic analysis. *Front Pharmacol.* 2018;9:151.
25. Ruffo M, Parisi O, Amone F, Malivindi R, Gorgoglione D, De Biasio F, et al. Calabrian Goji vs. Chinese Goji: A comparative study on biological properties. *Foods.* 2017;6(4):30.
26. Oğuz İ, Değirmenci İ, Kafkas E. Determination of the total phenolic and anthocyanin contents, as well as the total antioxidant capacity, of black wolfberry (*Lycium ruthenicum*) fruits. *J Process Energy Agric.* 2019;23(4):158–61.
27. Islam T, Yu X, Badwal TS, Xu B. Comparative studies on phenolic profiles, antioxidant capacities and carotenoid contents of red goji berry (*Lycium barbarum*) and black goji berry (*Lycium ruthenicum*). *Chem Cent J.* 2017;11(1):59.
28. Pires TCSP, Dias MI, Barros L, Calhella RC, Alves MJ, Santos-Buelga C, et al. Phenolic compounds profile, nutritional compounds and bioactive properties of *Lycium barbarum* L.: A comparative study with stems and fruits. *Ind Crops Prod.* 2018;122:574–81.
29. Stanoeva JP, Stefova M, Bogdanov J. Systematic HPLC/DAD/MSn study on the extraction efficiency of polyphenols from black goji: Citric and ascorbic acid as alternative acid components in the extraction mixture. *J Berry Res.* 2021;11(4):611–30.
30. Xin G, Zhu F, Du B, Xu B. Antioxidants Distribution in pulp and seeds of black and red goji berries as affected by boiling processing. *J Food Qual.* 2017;2017:1–8.
31. Mocan A, Cairone F, Locatelli M, Cacciagrano F, Carradori S, Vodnar DC, et al. Polyphenols from *Lycium barbarum* (Goji) fruit European cultivars at different maturation steps: Extraction, HPLC-DAD analyses, and biological evaluation. *Antioxidants.* 2019;8(11):562.
32. Teixeira F, Silva AM, Delerue-Matos C, Rodrigues F. *Lycium barbarum* berries (Solanaceae) as source of bioactive compounds for healthy purposes: A review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(5):4777.
33. Mocan A, Moldovan C, Zengin G, Bender O, Locatelli M, Simirgiotis M, et al. UHPLC-QTOF-MS analysis of bioactive constituents from two Romanian Goji (*Lycium barbarum* L.) berries cultivars and their antioxidant, enzyme inhibitory, and real-time cytotoxicological evaluation. *Food Chem Toxicol.* 2018;115:414–24.

34. Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res.* 2010;165(6):496–504.
35. Yan Y, Peng Y, Tang J, Mi J, Lu L, Li X, et al. Effects of anthocyanins from the fruit of *Lycium ruthenicum* Murray on intestinal microbiota. *J Funct Foods.* 2018;48:533–41
36. Morais CA, De Rosso VV, Estadella D, Pisani LP. Anthocyanins as inflammatory modulators and the role of the gut microbiota. *J Nutr Biochem.* 2016 Jul;33:1–7.
37. Skenderidis P, Petrotos K, Giavasis I, Hadjichristodoulou C, Tsakalof A. Optimization of ultrasound assisted extraction of goji berry (*Lycium barbarum*) fruits and evaluation of extracts' bioactivity. *J Food Process Eng.* 2017;40(5):e12522.
38. Kumar H, Guleria S, Kimta N, Nepovimova E, Dhalaria R, Dhanjal DS, et al. Selected fruit pomaces: Nutritional profile, health benefits, and applications in functional foods and feeds. *Curr Res Food Sci.* 2024;9:100791.

4. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДИСЕРТАЦИЈЕ

Рад у врхунском међународном часопису (M21):

- **Пић Т, Ђуричић И, Кодранов И, Ушјак Лј, Колашинас С, Милenkовић М, Марчећић М, Божић Д, Видовић В.** Nutritional value, phytochemical composition and biological activities of *Lycium barbarum* L. fruits from Serbia. *Plant Foods for Human Nutrition* 2024; 79: 662-668. **IF 2023 = 3,1; Plant Sciences (67/236)**
- **Пић Т, Додевска М, Марчећић М, Божић Д, Кодранов И, Видовић В.** Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial properties of goji berries cultivated in Serbia. *Foods* 2020; 9(11): 1614. **IF 2020 = 4,350; Food Science & Technology (37/144)**

Рад у истакнутом међународном часопису (M22):

- **Пић Т, Крговић Н, Божић Д, Самардџић С, Марчећић М, Здунчић Г, Видовић В.** Polyphenols profile and *in vitro* biological activities of black goji berries (*Lycium ruthenicum* Murr.). *Journal of Berry Research* 2024; 14(1): 15-28. **IF 2023 = 1,5; Plant Sciences (138/236)**

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34):

- **Пић Т, Божић Д, Марчећић М, Видовић В.** Chemical composition and *in vitro* biological activities of *Lycium* fruits cultivated in Serbia. 15th Congress of Nutrition, Food Nutrition, and Health Within the Framework of Sustainable development. Belgrade, Serbia, November 20-22, 2024.
- **Пић Т, Крговић Н, Милenkовић М, Кодранов И, Видовић В.** Physico-chemical properties, bioactive compounds, and *in vitro* biological activities of goji berry juice. Abstract book of the 22nd World Congress of Food Science and Technology (IUFoST 2024), 8-12th September 2024, Rimini, Italy, pp 635-636.
- **Пић Т, Самардџић С, Здунчић Г, Божић Д, Марчећић М, Видовић В.** Screening of the phenolic composition and *in vitro* biological activities of the fruit of *Lycium ruthenicum* Murray. 1st European Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food, Belgrade, Serbia - September 7-9, 2022, pp 21.

- **Пић Т**, Krgović N, Marčetić M, Vidović B. Phytochemical composition and *in vitro* biological activities of goji berry cultivated in Serbia. Book of Abstracts/Unifood conference, University of Belgrade, Belgrade, September 24-25, 2021, pp 110.

Саопштење са националног скупа штампано у изводу (M64):

- **Пић Т**, Kodranov I, Kolašinac S, Ivanović H, Vidović B. Analysis of mineral contents of fruits of *Lycium barbarum* L. (Solanaceae) cultivated in Serbia. Proceedings of the 8th Serbian Congress of Pharmacy with international participation. Belgrade, Serbia, 12th–15th October 2022. Arhiv za farmaciju, 72:S507-S508.

5. ЗАКЉУЧАК – ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

У оквиру ове докторске дисертације извршена је анализа хемијских и нутритивних карактеристика, као *in vitro* биолошких активности плодова свежих плодова *L. barbarum*, *L. barbarum* var. *aurauticarpum* и *L. ruthenicum* гајених у Србији. Имајући у виду да су поједине врсте, које су предмет проучавања ове докторске дисертације до сада само делимично испитане, добијени резултати и њихова компаративна анализа пружају оригинални допринос унапређењу знања о хемијском саставу и биолошкој активности плодова мање проучаваних *Lycium* врста, као што су *L. barbarum* var. *aurauticarpum* и *L. ruthenicum*.

Разлике у нутритивним карактеристикама, садржају биоактивних једињења и биолошким активностима између плодова *L. barbarum* гајених у различитим деловима Србије, указује на значај будућих истраживања у циљу идентификовања хемијских једињења која могу послужити за утврђивање порекла плодова *L. barbarum* из различитих региона или праћење ефеката примењених агротехничких мера у циљу оптимизације нутритивних и функционалних својстава плодова гоџи.

Оригинални научни допринос ове докторске дисертације се огледа и у детаљној хемијској карактеризацији споредних производа прераде плодова *L. barbarum*, пулпе и погаче, који могу представљати изворе протеина, влакана, као и других биоактивних једињења.

Оптимизација процеса екстракције биоактивних једињења из плодова и споредних производа прераде плодова *L. barbarum*, попут укупних полифенола, флавоноида и полисахарида, којима се повећава антиоксидативни и антиензимски потенцијал добијених екстраката може бити од користи у прехранбеној и фармацеутској индустрији.

6. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу извештаја о провери оригиналности докторске дисертације коришћењем програма *iThenticate* регистровано подударање текста износи 16%. Овај степен подударности је последица коришћења терминологије карактеристичне за област, уобичајено коришћених фраза у опису и тумачењу резултата, стандардне опреме и супстанци за припрему узорка, претходно публикованих резултата истраживања докторанда, општих места и података, што је у складу са чланом 9. Правилника. Све појединачне подударности су на нивоу од 1% или мање.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације маг. фарм. мед. биохем. Тијане Илић, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

У Београду,
27.12.2024. године

Ментор:

Др сц. Бојана Видовић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

7. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Докторска дисертација кандидаткиње маг. фарм. мед. биохем. Тијане Илић, чија је израда одобрена одлуком бр. 61206-4570/4-21 од 30. новембра. 2021. године на седници Већа научних области медицинских наука Универзитета у Београду под називом „Хемијски састав и биолошка активност плодова *Lycium barbarum L.* и *Lycium ruthenicum Murr. (Solanaceae)* гајених у Србији“ задовољава критеријуме оригиналног научног дела. Кандидаткиња је успешно реализовала постављене циљеве истраживања, а резултати приказани у овој докторској дисертацији представљају оригинално и самостално научно дело са значајним научним доприносом у области броматологије. Резултати ове докторске дисертације су публиковани у два рада у врхунским међународним часописима (M21), једном раду у истакнутом међународном часопису (M22), четири саопштења на међународним скуповима (M34) и једном саопштењу са скупа националног значаја (M64), штампана у изводу.

На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду да прихвати овај позитиван Извештај о завршеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, 30.12.2024. год.

Чланови Комисије:

Др сц. Мирјана Марчетић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Драгана Божић, ванредни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Јелена Ђуриш, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Брижита Ђорђевић, редовни професор
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

Др сц. Гордана Здунић, научни саветник
Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“