

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU HEMIJSKOG FAKULTETA UNIVERZITETA U BEOGRADU

Odlukom Nastavno-naučnog veća Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, sa sednice održane 10. marta 2016. godine, imenovani smo za članove Komisije za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije kandidata mr Dijane D. ĐUROVIĆ, diplomiranog hemičara za istraživanje i razvoj, specijaliste sanitarne hemije, Instituta za javno zdravlje Podgorica, pod naslovom: “ISPITIVANJE KONCENTRACIJE GVOŽĐA, CINKA I BAKRA I ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA U MAJČINOM MLIJEKU, SERUMU BEBA I MAJKI I HRANI ZA ODOJČAD”.

Nakon pregleda predate doktorske disertacije, Komisija podnosi sledeći:

I Z V E Š T A J

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija mr Dijane D. Đurović pod navedenim naslovom napisana je na 156 strana formata A4, sa proredom 1,5 (2400 karaktera sa razmakom). Sadrži 27 tabela i 50 grafičkih prikaza i slika. Podeljena je na sledeća poglavlja: Uvod (6 strana), Pregled literature (51 strana), Materijal i metode (11 strana), Rezultati i diskusija (48 strana), Zaključci (4 strane) i Literatura (32 strane) sa 305 literaturnih navoda. Disertacija pored navedenog sadrži i Spisak skraćenica, Izvod, Abstract i Biografiju sa bibliografijom kandidata, kao i potrebne Izjave u skladu sa zahtevima za repozitorijum.

U **Uvodu** kandidat definiše predmet istraživanja doktorske disertacije koja se odnosi na ispitivanje nove metode pripreme uzoraka infant formula i humanog mleka zasnovane na ekološkim principima, bez utroška agresivnih hemikalija u cilju određivanja sadržaja gvožđa, bakra i cinka. Tema doktorske disertacije obuhvata uporedno ispitivanje sadržaja gvožđa, bakra i cinka u humanom mleku i serumu beba u periodu laktacije, od prvog dana (uključujući i kolostrum) do 6 meseci. Osim navedenih elemenata ispitivan je i ukupan antioksidativni potencijal humanog mleka, infant formula i seruma majki i beba. Ispitivanje značaja mikroelemenata majčinog mleka, infant formula i seruma kao i antioksidativnog potencijala obuhvata uporedna ispitivanje primenom ICP-OES (indukovano spregnuta plazma-optički emisijski spektrometrija) i FAAS (plamena atomska apsorpciona spektrometrija) metoda za određivanje koncentracija navedenih elemenata, primenu metoda određivanja kapaciteta apsorpcije kiseoničnog radikala (ORAC), oksidativno redukcionog potencijala (ORP) i elektron-paramagnetne rezonance (EPR), kojima se može relativno lako i jednostavno odrediti ukupan antioksidativni potencijal humanog mleka i hrane za bebe, kao i DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metodu za evaluaciju antioksidativnog kapaciteta majčinog mleka, infant formula i seruma majki i beba.

Odeljak **Pregled literature** daje opis značaja ispitivanih mikroelemenata, njihov metabolizam i sadržaj u humanom mleku, infant formulama i serumu kao i preporučeni dnevni unos u cilju održavanja njihovog balansa u organizmu. Dat je kratak pregled metoda pripreme uzoraka i instrumentalnih metoda za određivanje elemenata u

tragovima. Takođe je opisan mehanizam antioksidativnog dejstva i metoda za određivanje antioksidativnog kapaciteta-(EPR, ORP i DPPH). U ovom delu je dat opis sastava i antioksidativnih svojstava majčinog mleka i nekih infant formula.

Poglavlje **Materijal i metode** sadrži detaljno opisane ispitivane uzorke i njihove karakteristike, postupak validacije primenjenih metoda (ICP-OES i FAAS), postupke za određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala uzoraka majčinog mleka i hrane za bebe, i to ORAC, ORP, EPR uz "spin trapping" i DPPH metoda ispitivanja antioksidativnog kapaciteta seruma majki i beba, majčinog mleka i infant formula.

Rezultati i diskusija prikazuju rezultate dobijene tokom istraživanja i njihovu diskusiju, i to: a) novi način pripreme uzorka humanog mleka i infant formula bez degradacije primenom ICP-OES i FAAS kroz validacionu studiju, b) sadržaj gvožđa FAAS, bakra i cinka ICP-OES metodom u mleku majki terminskih beba i serumu beba u periodu od 6 meseci laktacije, c) sadržaj gvožđa FAAS, bakra i cinka ICP-OES metodom u mleku majki pretermijskih beba i serumu beba u periodu od 6 meseci laktacije, d) uticaj koncentracije gvožđa, bakra i cinka na antioksidativni status majčinog mleka, seruma majki i beba, i infant formula, e) antioksidativni kapacitet humanog mleka nakon različitih postupaka obrade merenjem EPR i ORP, f) antioksidativni kapacitet seruma majki i beba, kao i mleka i infant formula primenom DPPH metode, g) statistička analiza dobijenih rezultata.

Autor u delu **Zaključci** sumira i ukratko opisuje najznačajnije rezultate svoga rada.

B. PRIKAZ POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru ove doktorske disertacije u prvoj fazi rađena je uporedna validacija ICP-OES i FAAS metoda nakon pripreme uzoraka infant formula i referentnog materijala na brz, jednostavan i ekološki prihvatljiv način bez upotrebe agresivnih hemikalija, jednostavnim rastvaranjem uzorka u Mili-Q vodi. Za ispitivane cinka, gvožđa i bakra, kao najvažnijih esencijalnih elemenata u tragovima, koeficijenti korelacije su bili veći od vrednosti potrebnih za metodu ($R > 0,999$). Unutar mernog opsega, odstupanja od teorijskih vrednosti nisu prelazila 5%. Standardna devijacija (SD) bila je 4% za Zn, 8% za Fe, 1 % za Cu primenom ICP-OES metode i 3 % za Zn, 3 % za Fe i 0.6 % za Cu određene FAAS tehnikom. Koeficijent varijacije (CV) je bio prihvatljiv za humane uzorke ($CV < 7 \%$). Prosečan procenat prinosa (recovery) kretao se u rasponu od 90% do 94% za Zn, 90% do 102% za Cu prema ICP-OES i 97 % do 103 % za Fe prema FAAS. Na osnovu validacione studije može se zaključiti da su analitički parametri (linearnost, preciznost i tačnost) zadovoljavajući za određivanje Zn i Cu ICP-OES i Fe FAAS tehnikom.

Nakon validacije ICP-OES i FAAS metoda određen je sadržaj Fe, Cu i Zn u 116 uzoraka humanog mleka majki terminskih i pretermijskih beba kao i sadržaj ovih mikroelemenata u serumu beba. Glavni cilj je bio da se odrede koncentracije gvožđa, bakra i cinka u humanom mleku i serumu odojčadi i definiše postojanje korelacije među uzorcima tokom perioda laktacije (prvi dan do 6 meseci). Ova vrsta studije urađena je po prvi put na ovim prostorima i dobijeni podaci su veoma korisni za definisanje statusa ispitivanih mikroelemenata kod dojilja i uticaj na njihove vrednosti u serumu odojčadi. Sadržaj gvožđa, bakra i cinka se nije razlikovao u serumima terminske i pretermijske novorođenčadi sa i bez neonatalne žutice. Pored toga, nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama ispitivanih elemenata u serumu odojčadi različitog pola.

Koncentracije ispitivanih elemenata su vremenom opadale u uzorcima humaniog mleka. Sadržaj cinka u serumu je rastao i kod terminskih i pretermijskih beba, dok je sadržaj gvožđa i bakra opadao kod terminskih, a bio konstantan kod pretermijskih beba.

U okviru ove disertacije ispitivan je uticaj pasterizacije i čuvanja na antioksidativne parametre majčinog mleka kao i na sadržaj esencijalnih mikroelemenata, Fe, Cu i Zn. Merenjem ORAC i ORP ispitivan je antioksidativni potencijal humanog zrelog mleka i kolostruma. Metoda ORP prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji je primenjena po prvi put za određivanje antioksidativnog statusa majčinog mleka. Pasterizacija i čuvanje zrelog mleka nisu uticali na ukupan neenzimski antioksidativni kapacitet i ORP. Sadržaj esencijalnih mikroelemenata je u kolostrumu bio najveći što zajedno sa nižim vrednostima za ORP doprinosi činjenici da kolostrum ima najveći antioksidativni potencijal. Neenzimski antioksidativni sistemi u kolostrumu i zrelom mleku su različiti. Primenom EPR metode merenja antioksidativnog potencijala, kolostrum i zrelo mleko pokazali su značajnu sposobnost vezivanja hidrosil-radikala pri čemu je kolostrum pokazao superiorno antioksidativno dejstvo u poređenju sa zrelim mlekom, jer skoro potpuno uklanja HO• iz Fenton sistema. Majčino mleko obezbeđuje bolju antioksidativnu zaštitu nego infant formule, jer sadrži snažniji antioksidativni sistem. Majčino mleko neutrališe hidrosil-radikal pri čemu nastaju ugljenik-locirani i askorbil-radikal. Nastajanje ovih vrsta je manje kod infant formula u poređenju sa majčinim mlekom, pri istoj produkciji HO• radikala. Sadržaj Fe, Cu i Zn se nije značajno razlikovao u uzorcima zrelog, pasterizovanog i zamrznutog mleka, dok je u kolostrumu bio najveći što zajedno sa nižim vrednostima za ORP doprinosi činjenici da kolostrum ima najveći antioksidativni potencijal. Takođe, komparacijom sadržaja mikroelemenata i antioksidativnog potencijala u ispitivanim uzorcima, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna korelacija između sadržaja Fe, Cu i Zn i antioksidativnog kapaciteta infant formula.

Tokom rada kandidat je primenio i metodu UV/VIS spektrofotometrije, za merenje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala u infant formulama, humanom mleku i serumu majki i pretermijskih beba.

Antioksidativni potencijal seruma majki je veći u odnosu na serum prevremeno rođenih beba što ukazuje na činjenicu da postoji veza između nivoa biomarkera oksidativnog stresa u uzorcima krvi majke i novorođenčadi. Humano mleko ima najviši antioksidativni kapacitet u odnosu na infant formule i prilagođeno je potrebama odojčadi. Majčino mleko je važno za novorođenčad, koja su izložena djelovanju brojnih slobodnih radikala i reaktivnim kiseoničnim vrstama, u neonatalnim jedinicama.

Dobijeni eksperimentalni podaci obrađeni su bioinformatičkim programima.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA SA REZULTATIMA IZ LITERATURE

Esencijalni mikroelementi, odnosno elementi u tragovima, su supstance koje čine manje od 0,01% ukupne telesne mase. Gvožđe, cink i bakar spadaju u osnovne elemente koji su neophodni za rast i razvoj kako odojčadi tako i tokom celog života, obzirom da ulaze u sastav velikog broja enzima. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da neki elementi u tragovima, koji se ponašaju kao redoks katalizatori, mogu biti deo aktivnog mesta ili kofaktori antioksidativnih enzima, te se mogu ponašati i kao antioksidansi. Biodostupnost esencijalnih mikroelemenata kod odojčadi isključivo zavisi od kvaliteta majčinog mleka, tj. od sadržaja nutrijenata u majčinom mleku,

dužine dojenja i fizioloških faktora kao što su apsorpcija nutrijenata i uzimanje suplemenata, kako u trudnoći tako i u procesu dojenja. Veoma je važno poznavanje koncentracija esencijalnih mikroelemenata, posebno Zn, Cu, i Fe i oksidativnog statusa humanog mleka tokom laktacije i u infant formulama, za definisanje prehrambenih potreba za pojedine nutrijente i razumevanje fiziologije njihovog izlučivanja.

Oksidativni stres se češće pojavljuje u toku neonatalnog perioda, pošto mlađe gestaciono doba ima slabiji antioksidativni kapacitet i može da dođe do povećanja koncentracije slobodnih radikala i reaktivnih kiseoničnih vrsta. Dosadašnjim istraživanjima je utvrđeno da majčino mleko ima veoma veliki antioksidativni kapacitet u odnosu na infant formule, kao zamenu za majčino mleko.

Iako je mineralni sastav i aktivnost osnovnih antioksidanasa mleka poznat, postoji potreba da se pronađu brže i jednostavnije metode za ispitivanje sadržaja mikroelemenata i ukupnog antioksidativnog potencijala mleka. Do sada su razvijene različite metode pripreme i merenja ovih komponenti u bioloških tečnostima, koje su korisne za dobijanje ukupne slike o mineralnom statusu mleka i seruma kao i antioksidativnog potencijala telesnih tečnosti i njihove promene u različitim uslovima. Međutim, u literaturi su nedovoljno poznate jednostavne i brze metode pripreme koje ne zahtevaju primenu i utrošak hemikalija što je od značaja i za očuvanje životne sredine, i koje smanjuju vreme analize, a samim tim su i ekonomski isplativije, kao i tehnike za određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala mleka za bebe, iz originalnog uzorka, bez prethodnog tretmana, što je trend zelene analitičke hemije i analitičke biohemije.

Metode pripreme i analize testirane u ovoj doktorskoj disertaciji primenjene su prvi put za određivanje mineralnog i antioksidativnog potencijala humanog mleka i važnih dijetetskih proizvoda-hrane za odojčad. Rezultati disertacije primenom nove validovane analitičke metode omogućavaju brže, ekonomičnije i jednostavnije određivanje mineralnog sastava u odnosu na sadržaje Fe, Cu i Zn u različitim uzorcima humanog mleka, infant formula i seruma primenom savremenih instrumentalnih metoda. Takođe, dobijeni rezultati ukazuju na povezanost sadržaja pojedinih mikroelemenata na ukupan antioksidativni potencijal različitih hrana za bebe, primenom savremenih instrumentalnih tehnika i tako daju doprinos fundamentalnim saznanjima o ishrani odojčadi od prvih dana života, a naročito prevremeno rođene dece i dece rođene sa malom telesnom masom (manje od 1000 g). Rezultati prikazani u ovom doktoratu ukazuju na moguću primenu novih metoda kojima može lako i jednostavno da se odredi ukupni mineralni i antioksidativni potencijal majčinog mleka i infant formula, bez prethodnog tretmana. Takođe, antioksidativni potencijal je važan pokazatelj značaja hrane za bebe u sprečavanju oksidativnog stresa u postnatalnom doba.

Dobijeni rezultati upućuju i na moguće mehanizme dobrih efekata majčinog mleka na sadržaj esencijalnih mikroelemenata kod odojčadi koji doprinose rastu i razvoju beba sve u cilju definisanja optimalnog načina ishrane beba koji će zadovoljiti potrebe za mikroelementima u period od 1 do 6 meseca. Podaci o mineralnom sastavu i antioksidativnom potencijalu humanog mleka tokom laktacije i u infant formulama su važni za definisanje prehrambenih potreba za pojedine nutrijente i razumevanje njihove fiziologije. Primenjene metode mogu da budu relevantne za brzo i rutinsko merenje mineralnog i ukupnog antioksidativnog potencijala mleka, infant formula i seruma kao i za njihovu kvantitativu analizu.

D. OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI I SAOPŠTENJA KOJI ČINE DEO TEZE

Rad objavljen u vrhunskom međunarodnom časopisu (M₂₁)

1. V. Marinković, M. Ranković-Janevski, S. Spasić, A. Nikolić-Kokić, N. Lugonja, **D. Djurović**, S. Miletić, M.M. Vrvić, I. Spasojević, Antioxidative activity of colostrum and human milk: Effects of pasteurization and storage, *Journal of Pediatric, Gastroenterology and Nutrition*, **62** (2016) 901-906 (IF₂₀₁₅=2,400, Pediatrics 27/120).

Rad objavljen u istaknutom međunarodnom časopisu (M₂₂)

1. **D. Djurović**, B. Milisavljević, B. Mugoša, N. Lugonja, S. Miletić, S. Spasić, M. Vrvić, Zinc concentrations in human milk and infant serum during the first six months of lactation, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **42** (2017) 75-78 (IF₂₀₁₅=2,550, Biochemistry and Molecular Biology 156/289).

Rad objavljen u međunarodnom časopisu (M₂₃)

1. **D. Đurović**, B. Milisavljević, M. Nedović-Vuković, B. Potkonjak, S. Spasić, M.M. Vrvić, Determination of microelements in human milk and infant formula without digestion by ICP-OES, *Acta Chimica Slovenica*, DOI: 10.17344/acsi.2016.2582 (IF₂₀₁₅=1,167, Chemistry, Multidisciplinary 107/163).

Saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu (M₃₄)

1. M.M. Vrvić, N. Lugonja, S. Spasić, V. Marinković, **D. Djurović**, B. Mugoša; **Are preterm human milk fortifiers good solution for preterm infants nutrition?** Book of Abstracts of The Food Factor I Barcelona Conference, Barcelona (Spain), 2016, p. 14.
2. **D. Đurović**, M. Vrvić, B. Mugoša, Determination of zinc and copper in infant formula at Montenegrin market by ICP-OES, Book of Abstracts: Food Quality & Safety, Health & Nutrition, Skoplje (Macedonia), 2015, p. 135.

E. ZAKLJUČAK

Na osnovu izložene analize doktorske disertacije mr Dijane Đurović, diplomiranog hemičara za istraživanje i razvoj, Komisija je došla do zaključka da ona predstavlja originalan naučni doprinos u oblasti biohemije, posebno biohemije hrane i ishrane odojčadi, kako u fundamentalnom, tako i u primenjenom domenu u odnosu na esencijalne mikroelemente (cink, gvoždje i bakar) i antioksidativnih osobina majčinog mleka i infant formula i seruma majki i beba.

Deo istraživanja iz teze kandidat je publikovao kroz tri naučna rada u časopisima međunarodnog značaja iz kategorija M₂₁, M₂₂ i M₂₃, od kojih je na poslednja dva prvi autor, a na trećem i autor za korespondenciju. Koautor je i dva saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima koji su štampani u izvodu (M₃₄).

Imajući u vidu rezultate do kojih je kandidat došao u svojim istraživanjima prikazanim u doktoratu, kao i njihov naučni i praktični značaj, zadovoljstvo nam je da

predložimo Nastavno-naučnom veću Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu da podnetu doktorsku disertaciju **mr Dijane D. ĐUROVIĆ, diplomiranog hemičara za istraživanje i razvoj**, pod naslovom: **„ISPITIVANJE KONCENTRACIJE GVOŽĐA, CINKA I BAKRA I ANTIOKSIDATIVNOG STATUSA U MAJČINOM MLIJEKU, SERUMU BEBA I MAJKI I HRANI ZA ODOJČAD“**, prihvati i odobri njenu javnu odbranu za sticanje naučnog stepena **DOKTOR BIOHEMIJSKIH NAUKA**.

K o m i s i j a

Dr Miroslav M. VRVIĆ, redovni profesor-mentor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Nikoleta M. LUGONJA, naučni saradnik-mentor
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

Dr Dragan D. MANOJLOVIĆ, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vladimir BEŠKOSKI, docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Boban MUGOŠA, vanredni profesor
Medicinski fakultet u Podgorici, Univerzitet Crne Gore

Beograd, 08. maj 2017.