

ПРЕДМЕТ: Извештај Комисије за преглед и оцену докторске дисертације **Мирјане Д. Мосић**, мастер хемичара

На редовној седници Наставно-научног већа Хемијског факултета одржаној 08. јула 2021. године изабрани смо у Комисију за преглед и оцену докторске дисертације Мирјане Д. Мосић, мастер хемичара, под насловом:

„Упоредна анализа полифенолног састава, антиоксидативне и антимикробне активности пчелињег полена и мешавина полена и меда ”

Веће научних области природних наука Универзитета у Београду је, на својој седници одржаној дана 28. октобра 2021. године, на захтев Хемијског факултета, дало сагласност на предлог теме докторске дисертације (број одлуке: 61206-4249/2-21).

Пошто смо поднету дисертацију прегледали, подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

А. Приказ садржаја дисертације

Докторска дисертација кандидата Мирјане Д. Мосић написана је на српском језику, на 105 страна А4 формата (фонт Times New Roman величине 12 pt, са проредом 1) и садржи 43 слике, 19 табела, 4 једначине и 138 литературних навода. Дисертација се састоји из 7 поглавља: *Увод* (2 стране), *Општи део* (28 страна), *Експериментални део* (11 страна), *Резултати и дискусија* (41 страна), *Закључак* (3 стране), *Литература* (11 страна) и *Прилог* (3 стране). Поред тога, дисертација садржи: *Захвалницу* на српском језику, *Изводе* на енглеском и српском језику, *Садржај*, *Биографију* кандидаткиње на српском језику, *Списак објављених радова*, *Изјаву о ауторству*, *Изјаву о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада* и *Изјаву о коришћењу*. Дисертација је по својој структури и садржају у сагласности са стандардима које прописује Универзитет у Београду.

У **Уводу** су истакнуте добробити примене пчелињих производа у људској исхрани које се огледају у смањењу ризика од настанка многих болести, а такође и у њиховом лечењу. Наглашено је да су биолошки ефекти пчелињих производа у великој мери условљени присуством полифенолних једињења која делују као антиоксиданси, пружајући притом заштиту виталних компонената ћелија од оксидативног оштећења. С обзиром на сложеност и велику природну варијабилност хемијског састава пчелињих производа од које у великој мери зависи њихова биолошка активност, истакнута је потреба за сталним

унапређењем аналитичких поступака који се у таквим систематским испитивањима примењују. Наведено је да је циљ ове дисертације оптимизација постојећих и развој и примена нових метода анализе полифенолног састава, као важног параметра квалитета узорака пчелињег полена и мешавина полена и меда за успостављање стандарда квалитета, а такође и за поспешивање клиничких студија којима би била поткрепљена лековита својства пчелињих производа. Посебно су истакнуте методе које су развијене и по први пут примењене у анализи полифенолног профила пчелињег полена и њихов научни значај и допринос анализи и процени аутентичности пчелињих производа уопште.

Општи део је подељен у три тематске целине. У оквиру прве целине, *Пчелињи полен*, описан је најпре процес настајања, прикупљања и складиштења пчелињег полена. У наставку су наведени досадашњи подаци о хемијском саставу, нутритивним својствима, као и биоактивном потенцијалу пчелињег полена са посебним освртом на полифенолна једињења пчелињег полена, њихово порекло, структуру и антиоксидативно и антимикуробно дејство. На крају прве целине истакнут је тренд обогаћивања намирница пчелињим поленом у циљу побољшања нутритивних и функционалних карактеристика, као и продужетка рока трајања намирница. У складу са поменутиим трендом, на тржишту је приметно повећано присуство мешавина различитих пчелињих производа што је разматрано у другој целини, *Мешавине пчелињег полена и меда*. У овом делу су наведени резултати неколико истраживања спроведених у циљу процене утицаја додатка пчелињег полена у мед. Трећа целина, *Методе испитивања*, обједињује методе коришћене у оквиру ове дисертације за анализу полифенолног профила пчелињег полена и мешавина пчелињег полена и меда. Наведене су технике екстракције полифенолних једињења, пречишћавања и концентровања екстраката, принципи спектрофотометријске анализе и метода за тестирање антибактеријске активности полифенолне фракције испитиваних узорака. Такође је дат је опис метода течне хроматографије, са освртом на механизме хроматографског раздвајања полифенолних једињења условљених карактеристикама стационарне и мобилне фазе. Истакнута је предност ултраефикасне течне хроматографије у комбинацији са масеном спектрометријом за анализу сложеног полифенолног састава испитиваних узорака, као и предности високоефикасне танкослојне хроматографије која у комбинацији са дигиталном обрадом слике хроматограма и мултиваријантном анализом нуди могућност „екстраховања“ мноштва информација из хроматограма. Поступак обраде дигиталне слике хроматограма је детаљно описан. У последњем делу ове целине описане су статистичке методе анализе коришћене при обради резултата добијених у оквиру ове дисертације, међу којима је анализа главних компонената од посебног практичног значаја због могућности визуелног уочавања груписања узорака постигнутог применом формираних математичких и статистичких модела.

У оквиру поглавља **Експериментални део** наведени су материјал, реагенси и хемикалије које су коришћене током реализације експеримената. Такође је дат детаљан опис узорака и начин припреме мешавина полена и меда, након чега следи приказ експерименталних и статистичких процедура екстракције и карактеризације полифенолне фракције као и статистичких метода анализе коришћених у оквиру докторске дисертације.

Поглавље **Резултати и дискусија** састоји се из две целине које обједињују истраживања спроведена у оквиру ове дисертације. У оквиру прве целине најпре су дати резултати палинолошке анализе 24 узорака пчелињег полена на основу којих је извршено тумачење цветног порекла испитиваних узорака, након чега следи опис поступка оптимизације услова за примену нормално-фазне високоефикасне танкослојне хроматографије за добијање полифенолних профила анализираних узорака. Због сложености састава екстраката пчелињег полена одабрана су два система растварача који су обезбедили оптимално раздвајање полифенолних једињења различите поларности. Применом оба

система истовремено је анализирана и смеша стандардних једињења. У циљу идентификације једињења најпогоднијих за карактеризацију одређеног типа полена, подаци добијени након анализе слика хроматограма подвргнути су анализи главних компонената. На основу графичког приказа резултата уочено је груписање анализираних узорака у односу на биљно порекло, чиме се потврђује могућност примене високоефикасне танкослојне хроматографије, као брже и ефикасније методе у односу на захтевну палинолошку анализу, за процену аутентичности пчелињег полена у погледу његовог биљног порекла. У оквиру прве целине такође је наглашено да је применом ултраефикасне течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом, извршена идентификација двадесет седам флавонолних гликозида, од којих је осам први пут идентификовано у пчелињем полену. Истакнута је предност дате методе која се огледа у могућности одређивања структура полифенолних једињења на основу њихових специфичних спектралних карактеристика у комбинацији са хроматографским параметрима, без присуства одговарајућих стандардних једињења. С обзиром на доказану биолошку активност флавоноида у слободном, а такође и у гликозилованом облику, добијени резултати указују на високу биолошку вредност пчелињег полена, што такође потврђују и резултати спектрофотометријских тестова спроведених у циљу одређивања укупног садржаја полифенола и антиоксидативне активности анализираних узорака. Друга целина обухвата упоредну анализу полифенолних профила пчелињег полена, меда и мешавина полена и меда. Вредности укупног садржаја полифенола и антиоксидативне активности одређене спектрофотометријским тестовима указују на чињеницу да пчелињи полен, као богат извор биоактивних супстанци, утиче на побољшање нутритивних и биолошких карактеристика меда, што је потврђено резултатима упоредног *t*-теста, док је применом анализе варијансе утврђено да су укупан полифенолни садржај и антиоксидативна активност у мешавинама углавном одређени полифенолним профилима пчелињег полена. Посебна пажња, у оквиру друге целине, посвећена је примени и развоју нових метода високоефикасне танкослојне хроматографије за анализу полифенолне фракције мешавина меда са пчелињим поленом, додатно отежаних чињеницом да обједињују два природна производа специфичног полифенолног састава. Описана је оптимизација хроматографских услова нормално-фазне високоефикасне танкослојне хроматографије, као и развој реверзно-фазне методе, по први пут, за анализу полифенолних профила мешавина меда и полена. Добијени хроматограми су третирано као јединствени мултиваријантни „отисци прста“, односно скупови карактеристичних хроматографских сигнала. Даљом обрадом података применом анализе главних компонената, извршено је испитивање две појаве: утицај садржаја пчелињег полена на полифенолни профил мешавина (за сваку од три врсте меда засебно), као и утицај биљног порекла меда на полифенолни профил мешавина (за различите уделе пчелињег полена засебно). Последњи део ове целине односи се на резултате тестирања антибактеријске активности узорака пчелињег полена, меда и мешавина меда и полена у односу на одабране сојеве бактерија у циљу процене утицаја биљног порекла меда и удела пчелињег полена на антибактеријску активност мешавина. Дата процена извршена је применом Фишеровог теста најмање значајне разлике. Такође су одређене и минималне инхибиторне концентрације одабраних екстраката а добијени резултати су на крају указали на сложене механизме антибактеријског деловања који отежавају утврђивање везе између биљног порекла, полифенолног профила и антибактеријских својстава мешавина меда и пчелињег полена.

У поглављу **Закључак** сумирани су и прокоментарисани резултати добијени у оквиру докторске дисертације.

Наведена **Литература** (138 цитата) обухвата радове/књиге из области истраживања и покрива све делове дисертације.

У Прилогу су дати експериментални подаци добијени у оквиру проучавања описаних у поглављу Резултати и дискусија.

Б. Кратак опис постигнутих резултата

У оквиру ове докторске дисертације одређиван је полифенолни профил пчелињег полена и мешавина полена са монофлоралним и полифлоралним медом и проучаван његов утицај на биолошку активност и везу са биљним пореклом испитиваних узорака. Мешавине које су биле предмет овог истраживања разликовале су се према биљном пореклу меда а такође и по уделу пчелињег полена. Применом софистицираних аналитичких техника у комбинацији са хеометријским методама развијене су поуздане аналитичке процедуре за процену аутентичности пчелињег полена и мешавина полена и меда за које нису дефинисани параметри квалитета. Применом система ултраефикасне течне хроматографије (*Ultra-Performance Liquid Chromatography*, UPLC) у комбинацији са хибридним масеним спектрометром високе резолуције, идентификовано је 27 полифенола из класе гликозилованих флавоноида, облика у којем су флавоноиди најчешће присутни. Присутством полифенолних једињења условљени су биолошки ефекти свих испитиваних узорака што је потврђено упоредним спектрофотометријским одређивањем укупног фенолног садржаја и њихове антиоксидативне активности. Резултати спектрофотометријских тестова указују на чињеницу да пчелињи полен, као додаток, значајно побољшава антиоксидативна својства меда. Биолошка активност испитиваних узорака је такође потврђена тестирањем антибактеријске активности у односу на три Грам-позитивна и пет Грам-негативних сојева бактерија. У оквиру ове дисертације је, за процену аутентичности испитиваних узорака на основу карактеристичних полифенолних профила, развијена и по први пут примењена метода високоефикасне танкослојне хроматографије (*High-Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC). У условима нормално-фазне HPTLC у комбинацији са анализом слике хроматограма и мултиваријантним статистичким методама, постигнуто је груписање узорака пчелињег полена у односу на биљно порекло, док је у случају узорака мешавина полена и меда дошло до груписања у односу на различит садржај пчелињег полена у њима. Метода реверзно-фазне HPTLC је по први пут у оквиру ове дисертације примењена у анализи пчелињег полена и мешавина полена и меда. Примена ове методе омогућила је процену аутентичности меда у мешавинама пчелињег полена са монофлоралним и полифлоралним медом. Додатна предност примене реверзно-фазне HPTLC огледа се у томе што је еколошки прихватљивија с обзиром да су органски растварачи, попут дихлорметана и *n*-хексана као компоненте мобилне фазе, у овом случају замењени етанолом.

В. Компаративна анализа резултата кандидата са резултатима из литературе

Препарати који представљају мешавине пчелињих производа су све присутнији на тржишту. Пласирају се с циљем да се потрошачима понуди финални производ побољшаних карактеристика. За пчелињи полен и препарате који су мешавине полена и меда не постоје дефинисани параметри квалитета који се односе на биолошку активност ових производа. Досадашњим истраживањима утврђено је да су биолошки ефекти пчелињег полена у великој мери условљени присуством полифенолних једињења, моћних природних антиоксиданаса али је такође уочена изражена варијабилност полифенолног састава овог пчелињег производа условљена његовим биљним и географским пореклом као и бројним спољашњим факторима. Стога се јавља потреба за новим информацијама о сложеном полифенолном

профилу и биолошкој активности у циљу доприноса успостављању стандарда квалитета и поспешивању клиничких студија којима би била поткрепљена лековита својства пчелињег полена. С обзиром да до сада није извршена свеобухватна анализа пчелињег полена из Србије у овој дисертацији је применом ултраефикасне течне хроматографије спрегнуте са масеном спектрометријом високе резолуције идентификовано 27 гликозилованих флавоноида, од који је осам једњења ове класе по први пут идентификовано у узорцима пчелињег полена. Применом ове методе омогућена је идентификација непознатих једињења на основу њихових специфичних спектралних и хроматографских карактеристика, без коришћења одговарајућих стандардних једињења. Упоредним спектрофотометријским одређивањем укупног садржаја фенола и антиоксидативне активности узорака пчелињег полена, меда и мешавина полена и меда утврђено је да пчелињи полен представља додатак који значајно побољшава антиоксидативна својства меда. Биолошка активност узорака је такође потврђена у односу на одређене сојеве бактерија за које до сада у расположивој литератури није било података о тестирању. У оквиру ове дисертације по први пут су развијене и примењене методе високоефикасне танкослојне хроматографије за анализу полифенолних профила пчелињег полена и мешавина полена и меда. Оптимизовани су услови за примену нормално-фазне високоефикасне танкослојне хроматографије за добијање полифенолних профила узорака пчелињег полена на основу којих је, у комбинацији са анализом дигиталне слике хроматограма и анализом главних компонената, омогућена процена аутентичности пчелињег полена у погледу његовог биљног порекла брже и ефикасније у односу на, до сада широко примењивану, али временски и материјално захтевну мелизопалинолошку анализу. Након додатне оптимизације мобилне фазе нормално-фазна високоефикасна танкослојна хроматографија примењена је и у анализи мешавина полена и меда. У оквиру ове дисертације је за анализу датих узорака по први пут развијена и примењена метода реверзно-фазне високоефикасне танкослојне хроматографије. На основу добијених полифенолних профила уочен је доминантан утицај пчелињег полена у мешавинама у односу на мед у случају примене оба хроматографска система. Употребом реверзно-фазног хроматографског система дат је допринос развоју зелених метода у анализи природних прехранбених производа тиме што је замена конвенционалних органских растварача (попут дихлорметана и *n*-хексана) етанолом, као компонентом мобилне фазе, учинила методу еколошки прихватљивијом. Применом реверзно-фазне танкослојне хроматографије омогућена је процена аутентичности мешавина полена и меда, на основу полифенолних профила, у односу на биљно порекло меда, што претходно није било могуће утврдити на основу резултата спектрофотометријских тестова.

Г. Научни радови објављени у међународним часописима и саопштења са скупова који чине део докторске дисертације

Резултати испитивања у оквиру ове докторске дисертације објављени су у два научна рада. Један рад штампан је у врхунском међународном часопису (M21), а други у истакнутом међународном часопису (M22). Такође, резултати су презентовани у облику једног саопштења на научним скуповима националног значаја штампаних у изводу (M64).

Рад објављен у међународном часопису изузетних вредности (M21)

1. **Mosić Mirjana**, Trifković Jelena, Vovk Irena, Gašić Uroš, Tešić Živoslav, Šikoparija Branko, Milojković-Opšenica Dušanka. 2019. Phenolic Composition Influences the Health-Promoting Potential of Bee-Pollen. *Biomolecules*, 9(12): 783-797. <https://doi.org/10.3390/biom9120783>

Рад објављен у истакнутом међународном часопису (M22)

2. **Mosić Mirjana**, Trifković Jelena, Ristivojević Petar, Milojković-Opsenica Dušanka. 2023. Quality Assessment of Bee Pollen-Honey Mixtures Using Thin-Layer Chromatography in Combination with Chemometrics. *Chemistry and Biodiversity*, 20, e202201141. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202201141>

Саопштења на националним научним скуповима штампана у изводу (M64)

1. **Stanković Mirjana**, Trifković Jelena, Andrić Filip, Nedić Nebojša, Tešić Živoslav, Milojković-Opsenica Dušanka. Determination of polyphenolic compounds in bee pollen from Serbia by UPLC-LTQ-orbitrap MS-MS. *50th Meeting of the Serbian Chemical Society, Belgrade, Serbia* (2012), Book of Abstracts P16, ISBN 978-86-7132-048-1

Д. ПРОВЕРА ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Оригиналност ове докторске дисертације је проверена на начин прописан Правилником о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду (Гласник Универзитета у Београду, бр. 204/22.06.2018). Помоћу програма iThenticate, утврђено је да количина подударарања текста износи 21%. Овај степен подударности, који за три од 333 извора појединачно износи 1%, а за остале је мањи од 1%, последица је цитата, личних имена, афилијација, назива коришћених материјала и метода, односно тзв. општих места и података, као и претходно публикованих резултата докторандкињиних истраживања проистеклих из њене дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изложеног Комисија сматра да је докторска дисертација Мирјане Д. Мосић оригинална, као и да су у потпуности поштована академска правила цитирања, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Е. ЗАКЉУЧАК

На основу свега изложеног може се закључити да је у поднетој дисертацији под насловом „**Упоредна анализа полифенолног састава, антиоксидативне и антимикробне активности пчелињег полена и мешавина полена и меда**” кандидаткиња, мастер хемичар Мирјана Д. Мосић успешно одговорила на све постављене задатке који се односе на дефинисање полифенолних профила пчелињег полена и мешавина полена и меда применом савремених хроматографских и спектроскопских метода, које у комбинацији са мултиваријантном статистичком анализом омогућавају процену утицаја фитохемијског састава на биолошку активност анализираних узорака. Резултати истраживања проистекли из ове докторске дисертације објављени су у оквиру два научна рада, од чега један у врхунском међународном часопису (M21) и један рад у истакнутом међународном часопису (M22), као и једног саопштења на скупу националног значаја (M64).

Комисија сматра да резултати објављени у оквиру ове докторске дисертације представљају значајан и оригиналан научни допринос развоју и оптимизацији поузданих аналитичких процедура за успостављање стандарда квалитета пчелињег полена и мешавина пчелињег полена и меда заснованих на њиховој биолошкој активности условљеној сложеним полифенолним саставом. Овакав приступ се може применити и на анализу других природних производа сложеног и природно веома променљивог фитохемијског састава.

На основу свега изложеног Комисија сматра да се ова дисертација уклапа у савремене трендове аналитичке хемије и хемије хране, те на основу свега изложеног предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Хемијског факултета да прихвати поднету докторску дисертацију Мирјане Д. Мосић, под насловом „**Упоредна анализа полифенолног састава, антиоксидативне и антимикробне активности пчелињег полена и мешавина полена и меда**” и одобри њену одбрану.

У Београду, 3. 6. 2024.

Комисија:

др Душанка Милојковић-Опсеница, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Јелена Трифковић, редовни професор
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Петар Ристивојевић, доцент
Универзитет у Београду - Хемијски факултет

др Славиша Станковић, редовни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет