

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На III редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 09.12.2016. године, прихваћен је извештај ментора др Мирослава Живића и др Милана Жижића о урађеној докторској дисертацији **Мирзете Хаџибрахимовић** под насловом „Редукција ванадата у мицелијуму гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff: одређивање оксидационих стања у ћелији” и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Мирослав Живић, ванредни професор Универзитета у Београду - Биолошког факултета, др Милан Жижић, научни сарадник Универзитета у Београду - Института за мултидисциплинарна истраживања, др Тијана Цветић Антић, доцент Универзитета у Београду - Биолошког факултета, др Јоана Закшевска, научни саветник Института за општу и физичку хемију и др Ференц Пастор, научни сарадник Универзитета у Београду – Хемијског факултета.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација докторанда **Мирзете Хаџибрахимовић** под насловом „Редукција ванадата у мицелијуму гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff: одређивање оксидационих стања у ћелији” је написана према Упутствима за обликовање докторске дисертације Универзитета у Београду. Дисертација обухвата уобичајена поглавља, у оквиру којих су на одговарајућим местима приказане табеле и илустрације. На крају је наведена листа литературних навода који су цитирани у оквиру дисертације. Дисертација је написана на 91 нумерисаној страни, садржи 1 табелу, 35 слика и 144 литературна навода.

Анализа докторске дисертације:

У овој докторској дисертацији кандидат **Мирзета Хаџибрахимовић** је приказала резултате истраживања интеракције ванадијума у оксидационим стањима +4 и +5 са мицелијумом гљиве *Phycomyces blakesleeanus*.

У поглављу **УВОД**, кандидаткиња даје опште податке о физичким и хемијским особинама ванадијума и његовој распрострањености у природи. Највећа пажња у уводу је посвећена прегледу литературе о интеракцијама живих бића са ванадијумом. Међу живим системима са становишта објекта, најдетаљније су приказана сазнања о метаболизму

ванадијума у гљивама са посебним нагласком на *P. blakesleeanus*, као предмету изучавања ове дисертације, а што се структуре тиче акценат је дат на интеракцијама ванадијума са ћелијском мембраном. На крају је кандидаткиња посветила пажњу практичним аспектима коришћења ванадијума и његових једињења пре свега у медицини, са посебним освртом на третман дијабетеса типа II, али и његовим токсичним ефектима на жива бића. У вези с тим извршен је и кратак преглед литературе о улози гљива у биоремедијацији од токсичних метала, као једној од тема којих ће се кандидаткиња у овој дисертацији такође дотаћи. На крају увода дат је опис биологије врсте *P. Blakesleeanus*.

У оквиру поглавља **ЦИЉЕВИ РАДА** као основне задатке кандидаткиња наводи утврђивање способности гљиве *P. blakesleeanus* да редукује ванадијум у оксидационом стању +5 ($V(V)$) у микроларним концентрацијама и утврђивање механизма могуће редукције са посебним нагласком на улози ензима са ферицијанид редуктазном активношћу (*FeCNR*) који се показао као доминантан у редукцији $V(V)$ у милиларним концентрацијама. Поред тога кандидаткиња као основне задатке ове дисертације наводи и утврђивање значаја адсорпције $V(V)$ на ћелијски зид и усвајања $V(V)$ од стране хифа *P. blakesleeanus*, као и утврђивање облика $V(V)$ који гљива усваја, места где га акумулира по усвајању и биомолекула у ћелији са којима $V(V)$ може ступи у интеракцију интеракцију.

У поглављу **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** детаљно су описани услови за узгој мицелијума *P. blakesleeanus* у лабораторијским условима, као и процедуре за изолацију ћелијског зида и ћелијске мембране. У истом делу дат је приказ коришћених инструменталних метода за: а) праћење оксидоредукционих процеса ванадијума – поларографије једносмерном струјом (*DCP*), диференцијално пулсне поларографије (*DPP*) и електронпарамегнетне резонанце (*EPR*); б) установљавање врста ванадијума које гљива усваја и које се акумулирају у ћелији – ^{51}V нуклеарна магнетна резонанца (^{51}V *NMR*); в) дефинисање најзаступљенијих интеракција ванадијума са биомолекулима у мицелијуму *P. blakesleeanus* – раманска микроспектроскопија и г) биохемијско одређивање активности ензима за утврђивање чистоће изолованих мембрана и редукцију ферицијанида..

У одељцима **РЕЗУЛТАТИ** и **ДИСКУСИЈА** приказани подаци су презентовани у три веће целине. Детаљна анализа добијених резултата представљена је главним текстом, који на адекватан начин допуњују одговарајуће табеле и илустрације. На тај начин омогућено је лако праћење редоследа представљања резултата истраживања. Резултати су тумачени, дискутовани и поређени међусобно, као и са подацима из литературе. Ова дисертација представља један од првих покушаја коришћења *DCP* и *DPP* у *in situ* испитивањима оксидо – редукционих процеса на целом организму.

У првој целини су коришћењем ^{51}V *NMR* прво потврђене полазне претпоставке да је при концентрацијама већим од 2 mM у раствору доминантно присутан тетрамер $V(V)$, а при субмилиларним концентрацијама мономер $V(V)$. Затим је коришћењем исте методе показано да је при високим концентрацијама (80 $\mu\text{mol/g}_{sm}$, што одговара концентрацији од 20 mM у раствору тетрамер основна $V(V)$ врста која подлеже редукцији. Редукција је инхибирана у великој мери присуством ферицијанида и Cd^{2+} , чиме су потврђени *EPR* резултати који су указивали да је *FeCNR* основни ензим укључен у процес редукције и

показано да му је тетрамер $V(V)$ супстрат. Са друге стране утврђено је да гљива усваја ванадат у његовом изворном оксидационом облику, који гради комплекс са неким унутарћелијским органским једињењем.

У другој и најобимнијој целини кандидаткиња, користећи поларографске методе показује да мицелијум гљиве *P. blakesleeanus* смањује концентрацију $V(V)$ мономера у спољашњем раствору за око 27% у целокупном опсегу испитиваних концентрација (0.1 – 1 mM). Користећи ферицијанид као супстрат за који *FeCNR* показује већи афинитет него за $V(V)$ DCP мерења су показала да је око 8% $V(V)$ из спољашњег медијума редуковано до $V(IV)$, а 18% уклоњено из медијума не неки други начин, док потпуно одсуство ефекта Cd^{2+} указује да редукција није катализована *FeCNR* ензимом. Покушана је и биохемијска карактеризација *FeCNR*, међутим показало се да у изолацији ћелијске мембране из хифа постоји низ техничких потешкоћа услед којих је била немогућа изолација довољне количине мембрана. Оптимизацијом методе добијен је изолат мембрана прихватљиве чистоће, и показано је да оне садрже *FeCNR* активност, међутим није недвосмислено потврђено да ли овај ензим учествује у редукцији $V(V)$. EPR методом није регистрована значајна редукција мономера $V(V)$, што је у супротности са налазима DCP и указује или да је EPR била недовољно осетљива да региструје релативно низак ниво редукције или да инхибиторни ефекти ферицијанида који су регистровани DCP методом нису везани за редукцију мономера $V(V)$ већ за неки други процес (транспорт или везивање) којим је $V(V)$ у одсуству ферицијанида уклањан из спољашњег медијума.

Поларографска испитивања су даље показала да узрок смањења концентрације $V(V)$ мономера није ванћелијско формирање комплекса мономера $V(V)$ са ћелијским ексудатима, а у комбинацији са ^{51}V NMR резултатима, да значајан допринос не даје ни адсорпција за ћелијски зид. ^{51}V NMR мерења су показа да 90 минута по додавању 1 mM $V(V)$ сигнал мономера нестаје док се у спектру појављује сигнал сличног интензитета, који је настао као резултат везивања ванадата са неким интрацелуларним молекулом (–532 ppm), што указује да је основни облик интеракције мономера ванадата $V(V)$ са мицелијумом транспорт у ћелију. У овире ове целине је коришћењем поларографије испитивана интеракција мицелијума гљиве и са ванадијумом у оксидационом стању +4 ($V(IV)$) као производом редукције $V(V)$. Ова мерења су показала да мицелијум гљиве *P. blakesleeanus* у потпуности усваја $V(IV)$ из раствора, што се манифестује потпуним нестанком поларографских таласа пореклом од $V(IV)$. Поларографска мерења су показала и да мицелијум *P. blakesleeanus* има значајан капацитет за усвајање $V(IV)$ ($185 \pm 12 \mu\text{mol/g}_{sm}$), $V(V)$ ($104 \pm 2 \mu\text{mol/g}_{sm}$) и Cd^{2+} ($330 \mu\text{mol/g}_{sm}$), упоредив или чак бољи од неких гљива са већ доказаним биоакумулаторским својствима (*Coprinus commatus* нпр.), што отвара могућности за даља испитивања њених биоремедијаторских способности.

У трећој целини кандидаткиња је се бавила хемијом $V(V)$ по уласку у ћелију. ^{51}V NMR мерења су показала да се 90 минута по додавању 1 mM $V(V)$ у спектру појављује сигнал (–532 ppm) који је настао као резултат везивања ванадата са неким интрацелуларним молекулом. Да би се истражио идентитет таквог комплекса коришћена је метода раманске микроспектроскопије. Резултати ове методе су указали да би значајни молекули укључени у везивање ванадата могли бити полифосфати и фосфати, као што је показано порастом интензитета трака на 688, 1156 и 1190 cm^{-1} . Такође, пораст интензитета

траке на 1447 cm^{-1} , указује да се у разматрање могу узети и интеракције ванадијума са молекулима као што су полисахариди, протеини и/или липиди. Све промене установљене у раманским спектрима иду у прилог претпоставци о постојању комплекса ванадијума унутар ћелије.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ**, кандидаткиња сумира добијене резултате у виду закључака, где су извучене основне информације о механизму интеракције *P. Blakesleeanus* са ванадијумом у оксидационим стањима +4 и +5.

Поглавље **ЛИТЕРАТУРА** садржи 144 библиографске јединице. Литературни извори су адекватно цитирани на одговарајућим местима у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. Žižić M., Miladinović, Z., Stanić, M., **Hadžibrahimović, M.**, Živić, M., Zakrzewska, J. 2016. ^{51}V NMR investigation of cell-associated vanadate species in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium. *Res. Microbiol.* 167(6): 521 – 528. **(M22)**
2. **Hadžibrahimović, M.**, Sužnjević, D., Pastor, F., Cvetić Antić, T., Žižić, M., Zakrzewska, J., Živić, M. 2016. The interactions of vanadate monomer with mycelium of fungus *Phycomyces blakesleeanus*: reduction or uptake? *Anton. Leeuw. J. Microbiol.*, DOI: 10.1007/s10482-016-0808-0. **(M22)**

Б2. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **M. Hadžibrahimović**, D. Sužnjević, F. Pastor, J. Zakrzewska, M. Žižić, M. Živić: „Polarographic investigation of vanadium uptake / reduction in *Phycomyces blakesleeanus* mycelium“, 13th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, The Society of Physical Chemists of Serbia, 26 – 30 September 2016, Belgrade, Serbia. **(M33)**

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Мирзете Хаџибрахимовић** под насловом „Редукција ванадата у мицелијуму гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff: одређивање оксидационих стања у ћелији” представља савремену физиолошку и биофизичку студију интеракција гљиве *P. blakesleeanus* са ванадијумом у оксидационим стањима +5 и +4. По свом обиму, садржају, оригиналности добијених резултата, начину њиховог представљања и дискутовања у односу на обимну и релевантну литературу, поднети текст има све одлике докторске дисертације. Мирзета Хаџибрахимовић је на адекватан начин представила истраживачку област у којој је радила, и резултате до којих је дошла. На основу резултата сопствених истраживања и прегледа обимне литературе, показала је да је оспособљена да у овој области креира и изводи експерименте на другим, потенцијално економски значајним врстама гљива. Добијени резултати истраживања имају добру

перспективу, нарочито имајући у виду све већи интерес за истраживања коришћења ванадијума у оксидационим стањима +4 и +5 и њихових органометалних комплекса у лечењу дијабетеса типа II. Комисија сматра да докторска дисертација **Мирзете Хацибрахимовић** по свом приступу и интерпретираним резултатима, а узимајући у обзир потенцијалну применљивост резултата истраживања, представља значајан доринос познавању интеракција гљива са ванадијумом и први корак ка примени *P. blakesleeanus* у биоремедиацији. Део резултата проистеклих из докторске дисертације објављен је у два истакнута међународна часописа. На основу свега изложеног, комисија предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати позитиван Извештај комисије и одобри јавну одбрану ове докторске дисертације.

У Београду, 07.02.2017. године

КОМИСИЈА:

др Мирослав Живић, ванредни професор
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Милан Жижић, научни сарадник
Универзитет у Београду - Институт за
мултидисциплинарна истраживања

др Тијана Цветић Антић, доцент
Универзитет у Београду - Биолошки факултет

др Јоана Закшевска, научни саветник
Институт за општу и физичку хемију

др Ференц Пастор, научни сарадник
Универзитет у Београду - Хемијски факултет
