

SAVETU TEHNOLOŠKOG FAKULTETA

Predmet: Ocena uradjene doktorske disertacije
mr Draginje Peričin

Savet Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na svojoj sednici koja je održana 17. 12. 1987. godine, imenovao je Komisiju za ocenu uradjene doktorske disertacije Mr Draginje Peričin, asistenta Tehnološkog fakulteta, pod naslovom "Ispitivanje biohemijskih signala u petit mutantima kvasca - izazvanih benomilom" u sastavu:

1. Dr Stojan GRUJIĆ, red.prof. Prirodno-matematičkog fakulteta, Novi Sad,
2. Dr Jovan VUČETIĆ, vanr.prof. Prirodno-matematičkog fakulteta, Beograd,
3. Dr Suzana PETROVIĆ, vanr.prof. Tehnološkog fakulteta, Novi Sad,
4. Dr Nadežda Ružić, vanr.prof. Tehnološkog fakulteta, Novi Sad.

Komisija je pregledala doktorsku disertaciju kandidata i podnosi Savetu Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu sledeći

I Z V E Š T A J

Doktorska disertacija mr Draginje Peričin napisana je na 7 + 149 stranica kucanog teksta i sadrži 49 slika-dijagrama i 23 tabele. Dokumentovana je sa 215 literaturnih navoda. Rad je podeljen na sledeća poglavlja: Uvod, Opšti deo, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključak, Conclusion i Literatura.

U uvodnom delu kandidat ističe, na osnovu podataka medjunarodne organizacije OECD-a, potrebu i značaj istraživanja mutagenog dejstva hemijskih jedinjenja koja kroz svoju primenu dolaze u dodir sa čovekom. Medju hemijskim jedinjenjima koja pokazuju genotoksično dejstvo, svakako značajno mesto zauzimaju pesticidi zbog svoje široke primene u poljoprivredi. Prema sadašnjim propisima pesticidi se moraju ispitivati kako na karcinogenost, teratogenost i reprodukcijisku moć, tako i na mutagenost u najmanje dva test sistema od kojih se jedan odnosi na genske mutacije a drugi na hromozomske mutacije. Podaci iz literature ukazuju da genotoksično dejstvo naročito pokazuju pesticidi na bazi ditiokarbamata, benzimidazola, ftalamida i dr., pa se u svetu a i kod nas vrši njihovo preispitivanje na osnovu novih podataka o njihovom genotoksičnom dejstvu.

Za ispitivanje genotoksičnosti hemijskih jedinjenja upotrebljavaju se razni test-sistemi (eksperimentalni organizmi) pa i ćelije pekarskog kvasca. Poznato je da se mutageno dejstvo nekih hemijskih supstanci na ćelije kvasca odražava na pojavu tzv. petit mutanta. Neki hemijski mutageni pri određenim uslovima stvaraju petit mutante sa oštećenim disanjem koji se nazivaju i respiratorno-deficijentni mutanti (RD-mutanti), a neki pak petit mutanti nisu respiratorno-deficijentni. Promene i oštećenja u respiratornom lancu, svakako se mogu povezati sa specifičnim oštećenjem nekih konstituenata kod mitohondrija, čije su funkcionalne sposobnosti kontrolisane kako jedarnom tako i mitohondrijskom DNA.

Imajući u vidu sve gore navedeno, kandidat je kao cilj istraživanja postavio da se biohemijskim metodama istraži genotoksično dejstvo predstavnika benzimidazolskih pesticida (fungicida) benomila (metil-1-(butilkarbamoil)-2-benzimidazol karbomat). Naime, kandidat je pomoću specifičnih biohemijskih parametara na ćelijama i mitohondrijama trebao da istraži da li su petit mutanti dobiveni pod dejstvom benomila i respiratorno-deficijentni mutanti (RD-mutanti). Takodje, kandidat je na jednom divljem soju i odgovarajućem RD-mutantu

izvršio svestranu karakterizaciju mikroorganizama biohemijskim metodama kako bi uporedjivanjem mogao sagledati posledice genetičkih promena izazvanih benomilom.

U opštem delu kandidat daje pregled i izvode najznačajnijih radova o istraživanju mutagenog dejstva benomila posredstvom odredjenih test-sistema za utvrđivanje genskih i hromozomskih promena kao i primarnog oštećenja DNA. Isto tako dati su sažeto izvodi radova o RD-mutantima kao test-sistemu za utvrđivanje genotoksičnosti hemijskih jedinjenja. Navode se radovi o strukturi i biogenezi mitohondrija petit mutanta pekarskog kvasca, pri čemu su ustanovljene i odredjene razlike između citoplazmatskih (mitohondrijskih) i nuklearnih petit mutanta. Takodje su izneti značajniji radovi i njihovi zaključci o proteinskom i lipidnom sastavu membranskog sistema mitohondrija a koji su u bliskoj vezi sa istraživanjima kandidata.

Treće poglavlje doktorske disertacije, odnosi se na eksperimentalni rad kandidata. Iznete su osnovne karakteristike i poreklo ispitivanih divljih i pod dejstvom benomila mutiranih sojeva *Saccharomyces cerevisiae*, kao i način gajenja u aerobnim i semiaerobnim uslovima. Zatim su izneti osnovni principi metoda koje su u disertaciji primenjene. Treba istaći da je kandidat za rešavanje problema u svom radu morao da razradi i uhoda veći broj metoda koje se koriste u savremenoj biohemiji.

Četvrto poglavlje Rezultati, podeljeno je na sedam delova i sedam odgovarajućih podnaslova. Kandidat mr Draginja Peričin u ovom delu iscrpno izlaže rezultate do kojih je došla. Neki od važnijih rezultata sastoje se u sledećem:

Ćelije petit mutanata izazvane benomilom imaju smanjenu endogenu brzinu respiracije pet do šest puta u odnosu na brzinu respiracije ćelija divljeg soja (V_{RD} su od 153-191 $\mu\text{mol O}_2\text{l}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$, a V_R su od 920-1040 $\mu\text{mol O}_2\text{l}^{-1}\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Povećana koncentracija glukoze daje nelinearnu zavisnost i usporava brzinu respiracije kod viših koncentracija gde se postiže prividno zasićenje glukozom. Dobivene vrednosti za

Km za ćelije petit mutanata prema glukozi tri do šest puta su veće u odnosu na vrednosti kod ćelija divljeg soja ($Km_{RD} = 0,40-0,66$ mmol/l glukoze a $Km_R = 0,10-0,19$ mmol/l glukoze). Ovako smanjeni afinitet ćelija petit mutanata prema glukozi kandidat objašnjava da može biti posledica mutagenog dejstva benomila tako da dolazi do izmenjenog metabolizma (kataboličke represije). Ovaj zaključak potvrđuju i rezultati dobiveni za povećanu specifičnu aktivnost enzima heksokinaze kod petit mutanata za dva do tri puta. Isto tako, na osnovu povećane vrednosti specifične aktivnosti enzima glukoze-6-fosfat dehidrogenaze kod petit mutanata, kandidat zaključuje da je verovatno kod ovih ćelija veće učešće pentozno-fosfatnog puta u razgradnji glukoze ($G-6-PDH_R$ od $0,79-4,85 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ a $G-6-PDH_{RD}$ od $4,20-19,89 \mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$).

Smanjena sposobnost respiracije kod petit mutanata je svakako posledica oštećenja enzima u respiratornom lancu. Kandidat je ustanovio da petit mutant (RD-1) ima smanjeni sadržaj citohroma c i b i potpun gubitak citohroma aa₃ (R:aa₃ = $1,93 \cdot 10^{-5}$; b = $5,44 \cdot 10^{-5}$; c = $6,52 \cdot 10^{-5}$ mol/l; RD:aa₃ -; b = $3,69 \cdot 10^{-5}$; c = $4,71 \cdot 10^{-5}$ mol/l). Kako sadržaj citohroma zavisi od stepena aeracije ispitan je i uticaj kiseonika na sadržaj citohroma (aerobni i semiaerobni uslovi). Rezultati pokazuju da je sadržaj citohroma c i b u petit mutantima inducibilan kiseonikom ali gubitak citohroma aa₃ nije nadoknadjena povećanom aeracijom. Ova činjenica ukazuje da je gubitak citohroma aa₃ posledica mutagenog dejstva benomila kod ćelija petit mutanata.

Analizom ETP čestica kod ćelija petit mutanta (RD-1) takodje je uočen gubitak citohroma aa₃. Isto tako kandidat je ustanovio da ćelije petit mutanta (RD-1) imaju smanjenu aktivnost drugih enzima respiratornog lanca kao što su: NADH-oksidaze, NADH-citohrom-c-reduktaze, mitohondrijska ATP-aza kao i gubitak sukcinat dehidrogenaze.

U cilju upoređivanja i sagledavanja svestranog metaboličkog stanja ćelija petit mutanata, kandidat je ispitivao proteinski i lipidni sastav ćelija.

Ukupni proteini ćelija petit mutanata imaju manji udeo proteina sa relativnim molaskim masama do 20000 (R - 61,55%; RD - 35,42%), a povećani udeo proteina sa relativnom molaskom masom preko 45000 (R - 13,08%; RD - 24,48%). I aminokiselinski sastav ukupnih proteina je različit, pri čemu je kod petit mutanata veća zastupljenost polarnih aminokiselina.

Lipidni sastav ćelija petit mutanata (RD-1) kvalitativno nije izmenjen u odnosu na divlji soj (R-1) ali je povećan sadržaj sn-diacilglicerola, slobodnih masnih kiselina i sn-triacilglicerola. Primenom gasne hromatografije, analizom sn-triacilglicerola i masnih kiselina je ustanovljeno da ćelije petit mutanata sadrže veći udeo triacilglicerola sa dužim lancima masnih kiselina. Kod masnih kiselina povećan je udeo palmito-oleinske kiseline (RD-C_{16:1} = 36%; R-C_{16:1} = 22%). Isto tako udeo svih nezasićenih masnih kiselina u petit mutantu (RD-1) iznosi oko 70% a u divljem soju (R-1) oko 50%.

Fosfolipidni sastav ispitivanih ćelija petit mutanta (RD-1) i divljeg soja (R-1) takodje se kvalitativno ne razlikuju. Medjutim, smanjen je sadržaj fosfatidil-holina u ćelijama petit mutanta.

Elektronskom mikroskopijom je ustanovljeno da postoje znatne morfološke razlike izmedju ćelija petit mutanta (RD-1) i nekih konstituenata (jedro, mitohondrije, ribozomi, lipidne vakuole, ćelijski zid) i kontrolnih ćelija (R-1). Kod ćelija petit mutanata uvećan je i izmenjen oblik kako samih ćelija tako i jedra, a smanjen je sadržaj ribozoma i mitohondrija. Ove rezultate kandidat je potvrdio analitičkim odredjivanjem sadržaja nukleinskih kiselina. Naime, utvrđen je veći sadržaj DNA a manji sadržaj RNA u ćelijama petit mutanta (R-DNA= 5,76 µg/mg proteina, RNA=158 µg/mg proteina: RD-DNA=9,00 µg/mg proteina, RNA=126 µg/mg proteina).

Polazeći od rezultata o izmenjenim aktivnostima ili potpunom gubitku nekih enzima u respiratornom lancu ćelija petit mutanta, kandidat je izvršio i analizu mitohondrija sa morfološkog, funkcionalnog i hemijskog aspekta. Dobiveni elektronski mikrograf pokazuje da ćelije petit mutanta (RD-1) imaju

mitohondrije izmenjenog oblika i smanjenog broja sa slabo razvijenim kristama i slične su "promitohondrijama" divljeg soja. Analizom proteina mitohondrijske frakcije dobiveni su rezultati koji pokazuju da ćelije petit mutanta imaju značajno smanjen udeo proteina sa relativnim molskim masama do 20.000, a povećan udeo proteina sa relativnim molskim masama iznad 20.000 u odnosu na divlji soj. Aminokiselinski sastav proteina mitohondrija pokazuje da su polarne amino-kiseline zastupljene sa oko 60% u proteinima mitohondrija petit mutanta (RD-1), a samo 48% u proteinima mitohondrija divljeg soja (R-1).

Kao i kod ispitivanih celih ćelija tako i kod mitohondrija petit mutanata fosfolipidni sastav nije kvalitativno izmenjen u odnosu na divlji soj. Medjutim, izmenjen je odnos Lipid/protein, povećan je i sadržaj kardiolipina (RD - CL = 88,50 μ g; R - CL = 23,50 μ g). Rezultati koji su dobiveni analizom masnih kiselina koje ulaze u sastav lipida mitohondrija ukazuju da je palmito-oleinska kiselina (C_{16:1}) zastupljena sa 43% u lipidima mitohondrija petit mutanata a samo 23% u lipidima divljeg soja. Medjutim, oleinska kiselina je više zastupljena u lipidima mitohondrija divljeg soja nego u petit mutantu.

Na osnovu svojih rezultata kao i na osnovu literaturnih podataka, kandidat u diskusiji objašnjava i donosi određene zaključke u vezi sa endogenom respiracijom i afinitetom usvajanja glukoze kod ćelija petit mutanata, zatim o promeni sadržaja citohroma, elektroforetskoj analizi ukupnih proteina i genskoj varijabilnosti, o promeni sadržaja lipidnih komponentata, sadržaju nukleinskih kiselina i morfologiji ćelije, jedra i mitohondrija. Isto tako diskutuje dobivene rezultate o strukturi, proteinskom i lipidnom sastavu samih mitohondrija kao i promene aktivnosti nekih mitohondrijskih enzima.

Na kraju svoje doktorske disertacije mr Draginja Peričin je u sažetom obliku, u poglavlju Zaključak, od dobivenih rezultata izdvojila neke koji su najbitniji.

ZAKLJUČAK I PREDLOG

Iz napred iznetog se jasno vidi da je kandidat mr Draginja Peričin pokazala visok stepen poznavanja biohemijskih procesa koji se odvijaju u ćelijama pekarskog kvasca, kako divljih sojeva tako i mutiranih pod dejstvom benomila, što je i bio predmet njene doktorske disertacije. Treba istaći da se kandidat već duži vremenski period bavi ovom izuzetno važnom problematikom, kako za nauku tako i za praksu, posebno za procenu rizika o genotoksičnosti hemijskih supstanci.

Rad kandidata predstavlja solidan naučni doprinos jer osvetljava biohemijske procese i na odredjeni način su okarakterisane promene važnijih konstituenata u ćelijama kvasca koje se dešavaju genotoksičnim dejstvom benomila.

Na osnovu svega izloženog, članovi Komisije predlažu Savetu Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu da rad mr Draginje Peričin pod naslovom "Istraživanje biohemijskih signala u petit mutantima kvasca - izazvanih benomilom", prihvati kao tezu za sticanje akademskog stepena doktora nauka i da kandidatu omogući da svoj rad javno brani.

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Dr Stojan GRUJIĆ, red.profesor
Prirodno-matematičkog fakulteta,
Novi Sad
2. Dr Jovan VUČETIĆ, vanr.profesor
Prirodno-matematičkog fakulteta,
3. Dr Suzana PETROVIĆ, vanr.profe-
sor Tehnološkog fakulteta, Novi
4. Dr Nadežda RUŽIĆ, vanr.profesor
Tehnološkog fakulteta, Novi Sad