

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Mirzeta R. Hadžibrahimović

**Redukcija vanadata u micelijumu gljive
Phycomyces blakesleeanus Burgeff:
određivanje oksidacionih stanja u ćeliji**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

University of Belgrade

Faculty of Biology

Mirzeta R. Hadžibrahimović

Vanadate reduction in mycelium of fungus

***Phycomyces blakesleeanus* Burgeff:**

determination of oxidation states in cell

PhD thesis

Belgrade, 2017.

Mentori:

Dr Živić Miroslav, vanredni profesor Biološkog fakulteta
Univerzitet u Beogradu, mentor

Dr Žižić Milan, naučni saradnik Instituta za multidisciplinarna istraživanja
Univerzitet u Beogradu, mentor

Članovi komisije:

Dr Zakrzewska Joanna, naučni savetnik Instituta za opštu i fizičku hemiju
Univerzitet u Beogradu

Dr Cvetić Antić Tijana, docent Biološkog fakulteta
Univerzitet u Beogradu

Dr Pastor Ferenc, naučni saradnik Hemijskog fakulteta
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova disertacija je urađena na **Institutu za multidisciplinarna istraživanja** – Opšta laboratorija i Laboratorija za elektrofiziologiju i **Institutu za opštu i fizičku hemiju** - Laboratorija za ispitivanje, istraživanje i razvoj (Odeljenje za elektrohemiju) i Laboratorija za NMR (projekat OI 173040).

Redukcija vanadata u micelijumu gljive *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff: određivanje oksidacionih stanja u ćeliji

Rezime

Ova doktorska teza predstavlja jedan od prvih pokušaja korišćenja polarografije za *in situ* ispitivanja oksido - redukcionih procesa na celom organizmu. Rezultati dobijeni pomoću tehnika polarografije jednosmerne struje (DCP) i diferencijano pulsne polarografije (DPP) pokazuju da micelijum gljive *P. blakesleeanus* smanjuje koncentraciju V(V) monomera u spoljašnjem rastvoru za oko 27 % u celokupnom ispitivanom opsegu koncentracija (0.1 – 1 mM).

Kako dosadašnji rezultati ukazuju da je tetramer V(V) podložan redukciji do V(IV) posredstvom enzima sa fericijanid reduktaznom aktivnošću (FeCNR), fericijanid je korišćen kao supstrat za koji FeCNR pokazuje veći afinitet nego za V(V), da bi se utvrdilo koji deo smanjenja koncentracije V(V) je posledica redukcije do V(IV). DCP merenja su ukazala da je oko 8 % V(V) redukovano do V(IV), dok je 18 % uklonjeno iz medijuma na neki drugi način. Potpuno odsustvo efekta Cd^{2+} , potentnog blokatora FeCNR, ukazuje da redukcija nije katalizovana FeCNR. Značajnija redukcija monomera V(V) nije pokazana EPR metodom što otvara mogućnost da inhibitorni efekti fericijanida registrovani DCP metodom nisu vezani za redukciju monomera V(V) već za njegov transport i vezivanje za micelijum.

Polarografski eksperimenti su dalje pokazali da aktivnost micelijuma *P. blakesleeanus* dovodi samo do snižavanja vrednosti I_d talasa c_5 , bez uticaja na njegov polutalasní potencijal $E_{1/2}$, što isključuje mogućnost da je stvaranje kompleksa V(V) sa eksudatima gljive uzrok smanjenja koncentracije V(V) monomera. DCP i ^{51}V NMR eksperimenti sa izolovanim ćelijskim zidom *P. blakesleeanus* su pokazali da nema značajne adsorpcije za ćelijski zid. Nakon dodavanja 1 mM V(V) micelijumu signal monomera nestaje iz ^{51}V NMR spektra, a u spektru se pojavljuje nov signal (– 532 ppm) sličnog intenziteta, kao

rezultat vezivanja vanadata za neki od intracelularnih molekula. To ukazuje da je osnovni vid interakcije V(V) monomera sa micelijumom njegov transport u ćeliju.

Uporedo sa V(V) vršena su polarografska ispitivanja interakcija micelijuma sa V(IV) kao proizvodom redukcije V(V). Ova merenja su pokazala da micelijum gljive *P. blakesleaanus* u potpunosti usvaja V(IV), što se manifestuje nestankom njegovih polarografskih talasa. Određen je kapacitet micelijuma za usvajanje V(IV) ($185 \pm 12 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$); V(V) ($104 \pm 2 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$) i Cd^{2+} ($330 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$), koji je uporediv sa kapacitetom nekih gljiva sa poznatim bioakumulatornim svojstvima.

Za određivanje molekulā u ćeliji koji bi mogli biti uključeni u vezivanje V(V) korišćena je ramanska mikrospektroskopija. Ramanski spektri su snimani u bazalnom delu hife, gde je prethodno dokazana najveća akumulacija vanadijuma pomoću XRF spektroskopije. Promene intenziteta traka na 688, 1156, 1190 i 1447 cm^{-1} ukazuju na moguće interakcije V(V) sa polifosfatima i fosfatima, kao i sa polisaharidima, proteinima i / ili lipidima.

Ključne reči: *Phycomyces blakesleaanus*, polarografija, vanadijum, bioakumulacija, redukcija, usvajanje.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biofizika

UDK broj: 582. 281: [502. 175 : 546. 881] (043. 3)

**Vanadate reduction in mycelium of fungus *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff:
determination of oxidation states in cell**

Abstract

This Thesis represents one of the first applications of polarographic method for *in situ* investigations of oxido - reduction processes in whole organism. The results obtained using DCP and DPP techniques have shown that in the presence of *P. blakesleeanus* mycelium concentration of added V(V) monomer decreased by 27 % in investigated concentration range (0.1 – 1 mM).

To find out if enzyme with ferricyanide reductase activity (FeCNR) is capable for monomer reduction, as it is a case for tetramer, ferricyanide was used as competitor for V(V) reduction. DCP results have shown that about 8 % of V(V) was reduced, while 18 % was removed from the solution. The addition of Cd²⁺ has shown no effect on DCP results, suggesting no participation of FeCNR in reduction. The absence of V(IV) signal in EPR spectrum after addition of V(V) monomer indicated that the main reason for fading out V(V) is its transport (in)to mycelium.

Polarographic experiments were also performed on isolated cell wall of *P. blakesleeanus*. It was concluded that there was no interaction of V(V) with cellular exudates, no adsorption / reduction on the cell wall was detected in ⁵¹V NMR spectrum. However, in ⁵¹V NMR spectra of mycelium treated with 1mM V(V) disappearance of monomer signal was recorded, with concomitant appearance of new signal at – 532 ppm, of similar intensity. This result confirms transport of V(V) monomer into the cell, and its binding to some of intracellular molecules.

The interaction of V(IV), as the main product of V(V) reduction, was also investigated using polarographic techniques. The obtained result has shown that all added V(IV) was removed from the buffer solution, manifested as disappearance of polarographic waves. Therefore, the capacity of *P. blakesleeanus* mycelium to uptake was estimated for V(IV)

($185 \pm 12 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{fw}}$); V(V) ($104 \pm 2 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{fw}}$) i Cd^{2+} ($330 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{fw}}$). This capacity puts *P. blakesleeanus* into the group of fungi known as good bioaccumulators.

To find out which molecules in cell could bind V(V), Raman microspectroscopy was performed, at the place of the highest vanadium accumulation (basal part of hyphae, as confirmed by XRF). The intensity changes of bands at 688, 1156, 1190 i 1447 cm^{-1} suggested involvement of polyphosphates / phosphates, polysaccharides and proteins or lipids in interaction with V(V).

Keywords: *Phycomyces blakesleeanus*, polarography, vanadium, bioaccumulation, reduction, uptake.

Scientific field: Biology

Narrow scientific field: Biophysics

UDK number: 582. 281: [502. 175: 546. 881] (043. 3)

SKRAĆENICE

ADP – adenzin difosfat

ATP – adenzin trifosfat

A. U. – arbitrarna jedinica

DPP – diferencijalno pulsna polarografija

DCP – polarografija jednosmerne struje

DME – živina kapajuća elektroda

EPR – elektronska paramagnetna rezonanca

$E_{1/2}$ – polutaladni potencijal

E_p – potencijal pika

FeCNR – fericijanid reduktaza (enzim sa fericijanid reduktaznom aktivnošću)

I_k – difuzionna strujna konstanta

I_d - granična difuzionna struja

Mo – MPT – molibden - molibdopteridat

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

PEG – polietilen glikol

Pi – neorganski fosfati

PM – ćelijska membrana

PSE – periodni sistem elemenata

SCE – saturisana kalomelova elektroda

sm – sveža masa micelijuma

V – vanadijum

V(V) – vanadijum oksidacionog stanja 5⁺, vanadat

V1 – monomer vanadata

V2 – dimer vanadata

V4 – tetramer vanadata

V(IV) – vanadijum oksidacionog stanja 4⁺, vanadil

XANES – (*eng., X – ray absorbtion near edge structure*)

XRF – (*eng., micro X – ray fluorescence imaging*)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Izvori vanadijuma i fizičko – hemijska svojstva.....	1
1. 2. Vanadijum u živim sistemima – usvajanje, tretman i uloga	3
1. 2. 1. Bakterije	3
1. 2. 2. Biljke, alge	6
1. 2. 3. Životinje	7
1. 2. 4. Gljive.....	10
1. 3. Moguća primena vanadijuma u medicini.....	13
1. 4. Vanadijum u ćelijskoj membrani	15
1. 5. Polarografska ispitivanja vanadijuma.....	15
1. 6. Toksični efekti vanadijuma.....	16
1. 7. Gljive u bioremedijaciji	17
1. 8. Biologija vrste <i>Phycomyces blakesleeanus</i>	18
2. CILJ RADA.....	21
3. MATERIJAL I METODE.....	22
3.1. Uzgoj spora.....	22
3.2. Uzgoj micelijuma	23
3.3. Izolacija ćelijskog zida	23
3.4. Izolacija ćelijske membrane	24
3.4.1. Razdvajanje na dvofaznom sistemu	24
3.4.2. Razdvajanje na saharoznom gradijentu	25
3.5. Priprema rastvorā	26
3.6. Polarografska merenja.....	27
3.7. NMR eksperimenti	28
3.8. EPR eksperimenti.....	29
3.9. Ramanska mikrospektroskopija	29
3.10. Biohemijske metode.....	30

3.11. Analiza podataka	31
4. REZULTATI.....	32
4.1. Polarografska ispitivanja	32
4.1.1. Polarografska svojstva vanadila i vanadata u puferu.....	32
4.1.2. Efekat micelijuma <i>P. blakesleeanus</i> na polarografske krive V(IV) i V(V).....	35
4.1.3. Efekat fericijanida (heksacijanoferata(III))	38
4.1.4. Efekat kadmijuma.....	42
4.1.5. Efekat uzgoja gljive na podlozi bez molibdata.....	43
4.1.6. Eksperimenti sa izolovanim ćelijskim zidom.....	44
4.2. ⁵¹ V NMR ispitivanja.....	45
4.3. EPR eksperimenti	52
4.4. Ramanska mikrospektroskopija	53
4.5. Biohemijska analiza izolovane ćelijske membrane.....	57
5. DISKUSIJA.....	62
6. ZAKLJUČCI.....	74
7. LITERATURA.....	76

„ I feel that if I make a serious experimental research effort (necessarily a very strenuous exercise) it should be in *Phycomyces*. I am still convinced that *Phycomyces* is the most intelligent primitive eukaryote and as such capable of giving access to the problems that will be central in the biology of the next decades. If I drop it, it will die. If I push it, it may yet catch on as phage ... caught on. Since I invested 25 years in this venture I might as well continue. I do not expect to make great discoveries, but if I continue to do the spade work my successors may do so. “

Max Delbrück

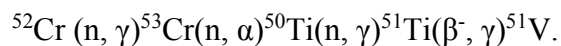
1. UVOD

Ubrzo nakon „ponovnog otkrića“ vanadijuma (otkriven je 1801., ali se smatralo da je u pitanju neprečišćeni hrom) - od strane švedskog hemičara Nils Gabriel Sefström – a 1830. god., počinje interesovanje biologa za ovaj prelazni metal. Sredinom XIX veka zabeleženi su prvi pokušaji da se objasni njegov fiziološki značaj, s obzirom na prisustvo i u živim sistemima. Akcenat je stavljan na ispitivanje njegove potencijalne uloge na prostetične grupe krvnih pigmenata morskih organizama ascidija i nekih poliheta. Kasnije, tokom XX i XXI veka utvrđena je uloga vanadijuma kao primarnog ili alternativnog akceptora elektrona u procesu oksidativne respiracije nekih bakterija i Archaea, pri čemu se vanadat (vanadijum(V)) u tom procesu redukuje do vanadila (okso - vanadijum(IV)) (*Zhang et al., 2013*). Takođe, rasvetljena je njegova uloga kao kofaktora u nitrogenazama cijanobakterija i haloperoksidazama pojedinih bakterija, algi i gljiva.

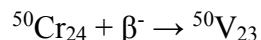
Vanadijum je s biološkog aspekta interesantan iz najmanje dva razloga. Vanadijum u oksidacionom stanju +5 (vanadat) je kao monomer elektronski i strukturno, sličan fosfatnom anjonu, što mu pruža mogućnost da interaguje sa brojnim fiziološkim supstratima i intermedijerima fosfatnog metabolizma. Kao posledica toga, vanadat je još krajem XIX veka našao primenu u tretmanu dijabetesa, kao i nekih kardiovaskularnih i neuralnih poremećaja (*Tsiani and Fantus, 1997; Rehder, 2008*). S druge strane, kao prelazni metal, vanadijum gradi mnoge koordinacione komplekse i, u fiziološkim uslovima, menja oksidaciona stanja od +3 do +5, što je detektovano kod brojnih, kako prokariotskih – bakterije i cijanobakterije, tako i eukariotskih – alge i gljive – organizama, u respiratornim i enzimatskim procesima.

1. 1. Izvori vanadijuma i fizičko – hemijska svojstva

Vanadijum (V, Z 23, Ar 50.9) je prelazni metal – Vb grupe periodnog sistema elemenata, kojoj pripadaju još niobijum, tantal i visoko radioaktivni dubnijum. Stvaranje vanadijuma u kosmosu bazirano je na α i γ raspadima do ^{52}Cr , a zatim prema reakcionom nizu



Izotop ^{51}V čini 99.75 % svih izotopa u prirodi, dok ostalih 0.25 % izotopa čini ^{50}V , koji nastaje u procesu elektronskog zahvata ^{50}Cr :



Brojne su njegove rude, prevashodno minerali kao što su roskolit, patronit i vanadinit, koji je otkriven još 1801. godine u centralnom Meksiku, nazvan, po izgledu i sastavu „*plomo pardo*“, braon olovo (*Rehder, 2013*). Vanadijum je posle cinka i bakra najzastupljeniji metal u litosferi, sa masenim udelom od oko 0.013 %. Široko je rasprostranjen i u hidrosferi. Podzemne vode i ostali izvori slatke vode sadrže vanadijum u obliku poliokso – anjona H_2VO_4^- , približne koncentracije 10 nM (*Rehder, 2012*). U morskoj vodi je posle molibdena najzastupljeniji prelazni metal; prosečna koncentracija vanadata, u formi jonskih parova $\text{Na}^+ \text{H}_2\text{VO}_4^-$, iznosi oko 35 nM. Sirova nafta takođe sadrži visoku količinu, 0.12 %, vanadijuma, najčešće u formi vanadil porfirina. Sadržaj vanadijuma - uglavnom u obliku vanadijum(IV) i –(V) oksida - u vazduhu varira između $10^{-3} \mu\text{g} / \text{m}^3$ u ruralnim oblastima i preko $1 \mu\text{g} / \text{m}^3$ u gradovima. Kad je reč o hrani, masti, voće i povrće sadrže 1 – 5 μg vanadijuma po kilogramu, dok meso, morski plodovi, integralne žitarice i mlečni proizvodi sadrže 5 – 30 μg vanadijuma po kilogramu (*Rehder, 2013*).

Shodno elektronskoj konfiguraciji sa pet elektrona u valentnim energetskim podnivoima, gradi jedinjenja u kojima su njegova oksidaciona stanja -1, 0, +1, +2, +3, +4 i +5. U oksidacionom stanju +2 u vodenim rastvorima V^{2+} – jon je ljubičaste boje. Što se tiče stepena oksidacije +3, predstavnici su V^{3+} - jon u vodenom rastvoru, zelene boje, zatim četiri trihalogenida, oksid – halogenidi sa hlorom i bromom, kao i crni vanadijum(III) – oksid.

Ipak, najstabilniji oksidacioni oblici vandijuma su +4 (oksivanadijum(IV) ili vanadil) i +5. Vanadil – jon, VO^{2+} u vodenom rastvoru je plave boje, kao i tetrahalogenidi, kovalentna jedinjenja vanadijuma (IV) koja ne sadrže kiseonik. U standardnim uslovima VCl_4 je tečnost, dok je VF_4 prah smeđe boje.

U standardnim uslovima vanadijum(V) je najstabilniji oblik vanadijuma. Najčešće se nalazi u obliku vanadijum(V) – oksida i u vodenom rastvoru se nalazi u obliku anjona V_2O_4^- čiji stepen protonizacije određuju koncentracija, pH i jonska jačina. Zakišeljavanjem rastvora vanadata nastaje dekavanadat $[\text{H}_n\text{V}_{10}\text{O}_{28}]^{(6-n)-}$ ($n = 0 - 3$, zavisno od pH), žute boje, ili, pri $\text{pH} < 2$, u zavisnosti od koncentracije bezbojni hidratizani dioksivanadijum monokatjon, $[\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ ili vanadijum(V) oksid V_2O_5 .

Jedinjenja različitog stepena oksidacije karakteristično su obojena, te je prvobitni naziv za vanadijum bio panhromijum (*Rehder, 2013*).

1. 2. Vanadijum u živim sistemima – usvajanje, tretman i uloga

1. 2. 1. Bakterije

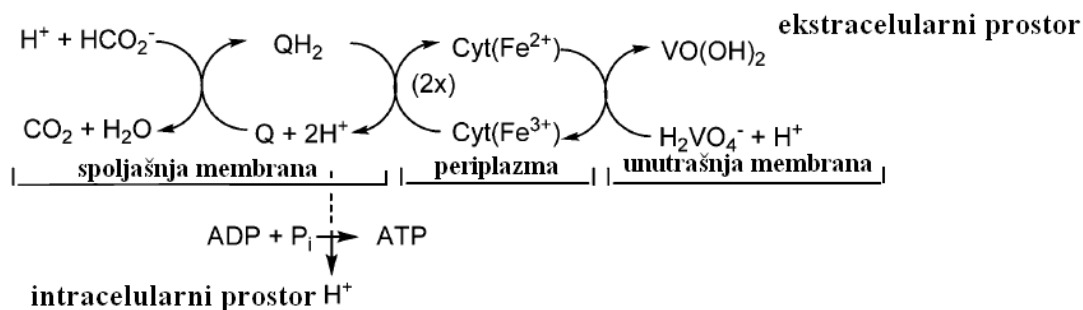
Redukcija

U procesu respiracije pojedinih bakterija i Archaea, pored jona metala kao što su Fe^{3+} , Mn^{4+} i U^{6+} , V^{5+} takođe predstavlja alternativni akceptor elektrona. *Shewanella oneidensis* iz zemljišta je najbolje proučena među bakterijama koje koriste vanadat kao akceptor elektrona (*Carpentier et al., 2003; Carpentier et al., 2005; Mayers et al., 2004*).

Pokazano je (*Carpentier et al., 2003; Carpentier et al., 2005*) da je redukcija vanadata biohemijski proces, koji zahteva intaktne i metabolički aktivne ćelije *S. oneidensis*. Takođe, da je redukcija vanadata konstitutivno prisutna u ovim bakterijama.

Terminalna vanadat reduktaza povezana sa spoljašnjom membranom katalizuje redukciju vanadata u vanadil. $\text{VO}(\text{OH})_2$ deponuje se uglavnom u periplazmi i spoljašnjoj membrani. Elektroni za redukciju H_2VO_4^- u VO^{2+} obezbeđuju se oksidacijom laktata u piruvat ili formata u CO_2 , na citosolnoj strani membrane. Elektroni se zatim prebacuju do spoljašnje

membrane kroz periplazmatični prostor posredstvom *hem* proteina citohrom *c* tipa, dospevajući konačno do vanadata vezanog za membranu (Rehder, 2015). Slika 1. 1. daje uprošćen prikaz navedenog procesa.



Slika 1. 1. Uprošćen prikaz transfera elektrona kroz ćelijsku membranu, počev od oksidacije formata na unutrašnjoj strani i sa završetkom, redukcijom vanadata na spoljašnjoj membrani. Q / QH₂ je menahinon / - hidrohinon. Elektronski transport od unutrašnje do spoljašnje membrane postiže se preko kaskade hem proteina citohrom *c* tipa. Vanadijum završava u mineralizovanoj formi zasnovanoj na VO(OH)₂. Transport protona u intracelularni prostor spregnut je sa formiranjem energijom bogatog ATP – a iz ADP – a i neorganskog fosfata HPO₄²⁻ (Pi) (Rehder, 2015).

U respiratornim redoks procesima protok elektrona je spregnut sa ispumpavanjem protona, što omogućava sintezu ATP – a i rast organizma. U disimilatornim redoks procesima, protok elektrona nije praćen kretanjem protona, kao što je slučaj kod bakterije *Vibrio parahaemolyticus*, koja redukuje vanadat, a živi u slanoj vodi (Rehder, 2008). S obzirom da vanadat može da izazove toksične efekte na ćelijski metabolizam - interferirajući sa fosfatazama, kinazama i ribonukleazama - pri čemu je jedan od ishoda i zaustavljanje rasta, transfer elektrona na taj jon predstavlja sredstvo za detoksifikaciju bakterijskog organizma. Još jedna bakterija, *Pseudomonas isachenkovii*, izolovana iz tunikata, sposobna je da redukuje vanadat iz morske vode. U navedenim primerima, donori elektrona su H₂, CO, šećeri, organske kiseline, glicerol, laktat, acetat (Lyalikova and Yurkova, 1992; Antipov et al., 2000; Carpentier et al., 2003; Carpentier et al., 2005; Mayers et al., 2000).

Potencijalna primena bakterija sposobnih da redukuju vanadat ogleda se u detoksifikaciji podzemnih voda koje ga sadrže u visokom procentu zbog rudarske delatnosti u neposrednoj okolini. *Geobacter metallireducens* je prisutna u subpovršinskim oblastima a sposobna je da – u eksperimentalno simuliranim uslovima – procesom respiratorne redukcije konvertuje vanadat prisutan u koncentracijama do 5 mM u vanadil, koristeći acetat kao izvor elektrona (Ortiz - Bernad et al., 2004). U eksperimentima na terenu, gde su podzemne vode sadržale vanadat u koncentracijama do 50 μ M, dodavanje acetata stimulisalo je redukciju vanadata od strane *G. metallireducens* do potpunog nestanka za samo nekoliko dana (Rehder, 2008).

Mezofilne i termofilne metanogene Archaea, kakva je *Methanothermobacter thermautotrophicus*, takođe imaju sposobnost redukcije V(V) u V(IV) preusmeravajući transfer elektrona u pravcu sa metanogeneze na redukciju vandata (Zhang et al., 2014).

Nitrogenaze

Za bakterije - prevashodno iz roda *Azotobacter* je krajem XX veka ustanovljeno da sadrže dva sistema za fiksaciju azota (Robson, 1986). Jedan, baziran na konvencionalnim nitrogenazama koje sadrže molibden kao kofaktor i drugi, alternativni sistem, koji funkcioniše u uslovima deficijencije molibdena. Postojanje alternativnog sistema dokazano je za jedan soj bakterije *Azotobacter chroococcum*, kod kojeg su konvencionalni geni za nitrogenazu bili deletirani, a fiksacija azota uprkos tome funkcionalna, zavisna od prisustva vanadijuma. Prečišćavanje nitrogenaze pokazalo je da je ona zapravo binarni sistem u kojem je molibdoprotein zamenjen vanadoproteinom (Robson et al., 1986; Cammack, 1986). Vanadijum – nitrogenazu sadrži i *Azotobacter vinelandii*, kao i nekoliko sojeva *Clostridium butyricum* (Jensen and Spencer, 1947), a takođe i filamentozne cijanobakterije *Anabaena azotica*, *Anabaena variabilis*, kao i neke iz roda *Nostoc* (Boison et al., 2006). Prisustvo ovog enzima ustanovljeno je i kod lišajeva iz roda *Peltigera* koji su u simbiozi sa nekim od navedenih cijanobakterija (Hodkinson et al., 2014).

Haloperoksidaze

Pored uloge kofaktora u aktivnom centru nitrogenaza, vanadijum je detektovan i kod bakterija iz roda *Streptomyces*, kao sastavni deo tzv. vanadat – zavisnih hloroperoksidaza, enzima koji oksidativno halogenizuju organske supstrate, pri čemu je oksidujuće sredstvo vodonik peroksid (*Bernhardt et al., 2011; Kaysser et al., 2012*). Pretpostavlja se da pojedine cijanobakterije sadrže sličan enzim, vanadat – zavisnu jodoperoksidazu (*Bernroitner et al., 2009*).

Enzimi haloperoksidaze, koje pored navedenih bakterija sadrže i alge, gljive i lišajevi, katalizuju dvoelektronsku oksidaciju halogena (X^-) peroksidom. Nastale X^+ vrste zatim učestvuju u oksidativnoj halogenaciji organskih supstrata (*Rehder, 2015*).

1. 2. 2. Biljke, alge

Što se tiče fiziološke aktivnosti vanadijuma u biljkama, krajem XIX veka je uočena inhibicija klijanja semena zelene salate i slačice u vodenom rastvoru „troboznog natrijum vanadata“, $Na_3 [VO_4]$ (*Priestly, 1876*). Prvo pominjanje prisustva vanadijuma u biljnom materijalu vezuje se za kratak članak Edmunda O. Von Lippman – a, 1888., i odnosi se na prisustvo vanadijuma u šećernoj repi (*Von Lippman, 1888*).

Haloperoksidaze

Krajem XX veka opisana je podgrupa – treća – enzima peroksidaza, tzv. vanadat – zavisne peroksidaze ili vanadat - zavisne haloperoksidaze, karakteristične za neke alge, prevashodno *Ascophyllum nodosum* iz klase Phaeophyceae, razdeo Heterokontophyta (*Vilter et al., 1983; Vilter, 1984; Jordan and Vilter, 1991*). Da bi enzim bio aktivan, apoenzim treba da sadrži vanadijum u formi vanadata (V), VO^{2+} se uglavnom ni ne usvaja, a redukovani holoenzim (koji sadrži VO^{2+}) je neaktivan. Za razliku od peroksidaza koje sadrže gvožđe i koje se u višku H_2O_2 kao akceptora elektrona deaktiviraju, vanadat –

zavisne haloperoksidaze su veoma otporne, kako na visoku koncentraciju vodonik peroksida i organskih rastvarača, tako i na visoku temperaturu, iznad 70 °C, i sinhrotrono zračenje (Rehder, 2008). Ove peroksidaze prisutne su sporadično i u crvenim algama *Corallina pilulifera* i *Corallina officinalis*, kao i u zelenim, *Halimeda spp.* Ovi enzimi katalizuju reakcije dvoelektronske oksidacije halogena, iz oksidacionog stanja -1 do oksidacionog stanja +1, kakva je npr. reakcija nastanka hipobromne kiseline iz bromida. Zavisno od supstratne specifičnosti, razlikuju se vanadat zavisne jodo - , bromo - i hlоро – peroksidaze (Rehder, 2008).

1. 2. 3. Životinje

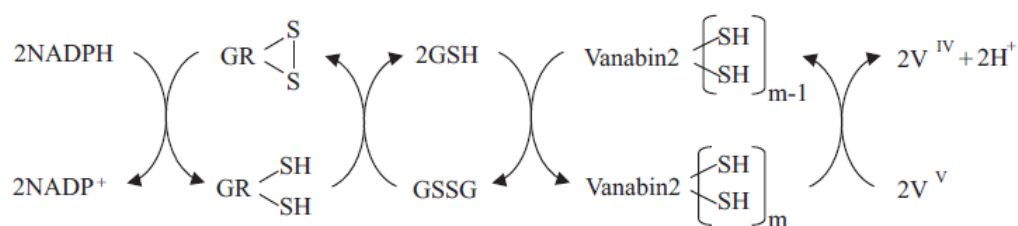
Kada su životinje u pitanju, prisustvo vanadijuma ustanovljeno je u krvi *Phallusia mamillata* Cuv., iz Napuljskog zaliva (Henze, 1911), vrste koja pripada klasi Ascidiacea, subfilum Urochordata ili Tunicata. Ovo otkriće je privuklo veliku pažnju, kako hemičara, tako i biohemičara i fiziologa, prevashodno iz dva razloga: 1. vanadijum bi mogao imati ulogu prostetične grupe u respiratornim pigmentima, slično gvožđu i bakru; 2. nikad ranije ni u jednom živom organizmu nije zabeleženo njegovo prisustvo u tako visokim koncentracijama (Michibata et al., 2003).

Redukcija

Među jedanaest, prevashodno morfološki različitih tipova ćelija, krv ascidija sadrži i vanadocite, prstenastog oblika, koje poseduju tzv. „vakuolu“. Vanadijum se u oksidacionom stanju V(V) unosi u organizam ascidije putem oralnog sifona i branhijalne kese. U citoplazmi vanadocita, vanadat se redukuje do V(IV) i vezuje za citoplazmatski transportni protein vanabin. Nakon transporta u „vakuolu“, dolazi do redukcije u V(III) Visoku koncentraciju protona obezbeđuje tzv. *V* – ATPaza (Michibata et al., 2000).

Naime, vanadat u ćelije verovatno ulazi kroz anjonske kanale (fosfatne i / ili sulfatne), uz pomoć Na⁺ - zavisnih fosfatnih transportera (Dingley et al., 1981). Rana istraživanja u oblasti usvajanja vanadijuma od strane *P. mamillata*, primenom radiokativno obeleženog ⁴⁸V vanadata pokazala su da se vanadijum prevashodno akumulira u branhijalnoj kesi

(Bielig *et al.*, 1961). Radioaktivni ^{48}V , $T_{1/2} = 16.2$ dana, je β^- i γ emiter. Tkivo ga preuzima sporo i u zavisnosti od starosti jedinke; sasvim zrele jedinke u vanadocitima nakon dva dana sadrže samo 2 % od ukupno preuzetog vanadijuma. S druge strane, inkorporacija radioaktivno obeleženog vanadata u krvne ćelije je brz proces, na 0°C $T_{1/2} = 50$ s. Vanadat u citoplazmu dospeva kroz fosfatne kanale (Dingley *et al.*, 1981), zatim biva translociran posredstvom metalnog transportera, preuzimaju ga tzv. vanabini (eng., *vanadium binding proteini*) koji ga redukuju u oksidaciono stanje +4, vanadil jon, oksovanadijum (IV), VO^{2+} , koji je vezan za vanabin (Michibata *et al.*, 2003; Ryan, *et al.*, 1992). Vanabin2, izolovan iz *Ascidia sydneinensis samea* je reprezentativan primer ovih proteina. Sadrži 120 amino kiselina, među kojima 18 cisteina, sa 9 disulfidnih veza (Hamada *et al.*, 2005). Vanabin2 katalizuje redukciju vanadata i sporadično skladištenje VO^{2+} . Jedan ili nekoliko cisteinskih parova odgovorni su za redukciju V(V) (Slika 1. 2), ali se ne zna koji od parova učestvuju u izgradnji aktivnog mesta, dok je vezivanje VO^{2+} zavisno od slobodnih amino grupa lizina i arginina (Yamamoto *et al.*, 2014). Drugi metalni transporter unosi vanadil jon u „vakuolu“, gde se odvija dalja redukcija, do oksidacionog stanja +3 - finalni korak koji i dalje ostaje nerazjašnjen. ATPaza karakteristična za „vakuolu“, $V - \text{ATPaza}$, upumpavanjem protona obezbeđuje neuobičajeno nizak pH unutar nje.

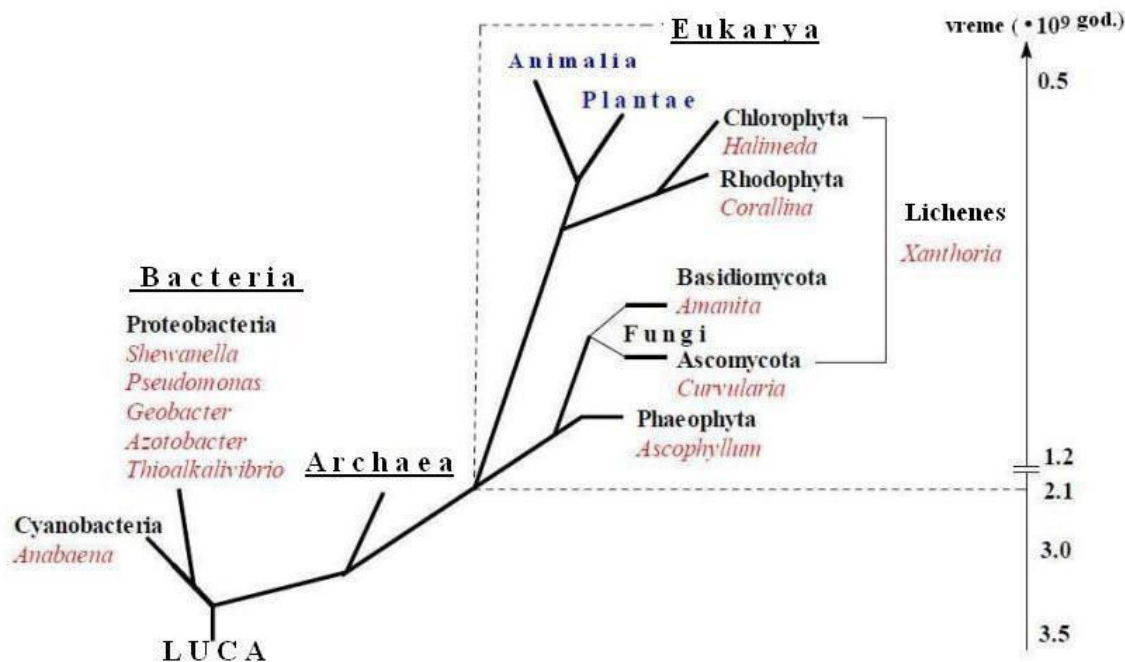


Slika 1. 2. Pretpostavljeni mehanizam redukcije vanadata delovanjem vanabina2. Donor elektrona je NADPH, a akceptor joni vanadijuma; zauzvrat, redukcija V(V) u V(IV) odvija se preko reakcija oksidacije tiola u disulfid (Yamamoto *et al.*, 2014).

Do sada je utvrđeno da je donor elektrona za redukciju vanadata (V) do oksovanadijuma (IV) NADPH, proizveden u pentozo fosfatnom ciklusu (Ryan, *et al.*, 1992). Dalja redukcija do V^{3+} u „vakuoli“ vanadocita *Phlebobranchia* ostaje nerazjašnjena, premda je za neke reduktante, uključujući i tzv. tunikohrome, pokazano, *in vivo* i *in vitro*, da su efikasni u redukciji V(V) do V(IV) i / ili V(IV) do V(III) (Rehder, 2008).

Ideja da bi vanadat i vanadil mogli igrati ulogu akceptora elektrona javila se na osnovu toga što vanadat zaista jeste primarni akceptor elektrona u bakteriji *S. oneidensis* (Ishii et al., 1994; Ishii et al., 1993; Ishii, 1998). Merenjem koncentracije rastvorenog kiseonika u ćelijama krvi ascidija uzorkovanih iz Atlantskog okeana i Pacifika (Macara and McLeod, 1979; Baldwin et al., 1984), utvrđeno je da se kapacitet vanadocita za vezivanje kiseonika gotovo ne razlikuje od kapaciteta morske vode.

Za morske crve *Pseudopotamilla ocellata*, kao i za još neke predstavnike istog roda, iz klase Polichaeta, filum Annelida, takođe je pokazano da akumuliraju vanadijum (Ishii et al., 1998; Ishii et al., 1994; Ishii, 1993). Vanadijum se koncentriše u „vakuolama“ apikalnih delova epidermalnih ćelija, zajedno sa sulfatima. Primenom mikroanalize X – zracima na živim jedinkama *P. ocellata*, utvrđeno je da je prisutni vanadijum u oksidacionom stanju +3 (Rehder, 2008), a pretpostavlja se da se na sličan način odigrava akumulacija vanadijuma i u *A. sydneinensis*, s obzirom na prisustvo istih antigena karakterističnih za vanadijum – vezujući protein. Uloga vanadijuma, koji je, ponekad u visokim koncentracijama - iznad 350 mM u *Ascidia gemmata* - prisutan u specijalizovanim krvnim ćelijama brojnih ascidija, i nekih cevastih poliheta, ipak je do danas ostala nejasna (Rehder, 2013). S obzirom da je u visokim koncentracijama toksičan, njegova akumulacija u ovim morskim organizmima možda bi mogla obezbeđivati njihovu odbranu od predatora (Rehder, 2015). Na Slici 1. 3. predstavljeni su organizmi koji usvajaju i koriste vanadijum.



Slika 1. 3. Filogenetsko stablo tri domena (Bacteria, Archaea, Eukarya) i primeri grupa organizama koji usvajaju i koriste vanadijum (u haloperoksidazama i nitrogenazama - **purpurna**) ili deponuju njegova jedinjenja - **plava**. LUCA (eng., *Last Uniform Common Ancestor*; *poslednji uniformni zajednički predak*). (Rehder, 2013; modifikovano).

1. 2. 4. Gljive

Kada je reč o gljivama, *Amanita muscaria* predstavlja poznat primer akumulacije visokih koncentracija metala, uključujući i vanadijum, kako u cilju obezbeđivanja njihove adekvatne koncentracije za učešće u biohemijskim procesima, tako i u smislu bioremedijacije, odnosno smanjenja njihovog prekomernog prisustva u okolini (Berry et al., 1999). Vanadijum je u ovoj gljivi i još dvema vrstama iz istog roda zastupljen u obliku jedinjenja amavadina. Amavadin je ne okso vanadijum(IV) kompleks male molekulske mase, svetlo plave boje u rastvoru, slično kao i proste soli vanadila, kakva je i vanadil sulfat.

Kao i u slučaju hemovanadina u ascidijama, (Rehder, 2013) uloga amavadina u *A. muscaria* ostaje nerazjašnjena, mada su, s obzirom na ulogu molibdena kao kofaktora u enzimima

oksidogenazama i deoksidogenazama, neretke bile pretpostavke o amavadinu kao komponenti nekog primitivnog redoks aktivnog enzima (*Frausto da Silva, 1989*). Oksidovana forma amavadina može biti efikasan katalizator reakcija oksidacije različitih vrsta jedinjenja, kao i reakcija građenja C – C veze pri sintezi složenijih organskih jedinjenja (*Rehder, 2013*).

Redukcija

Saccharomyces cerevisiae, pekarski kvasac, gljiva iz filuma Ascomycota, jednoćelijski je eukariotski organizam koji predstavlja model sistem za brojna biološka istraživanja. Kao takav, poslužio je i za ispitivanja redukcije vanadijuma. Primenom metode elektronske paramagnetne rezonance (EPR) detektovan je i vanadil jon (*Bode et al., 1990*) u ćelijama *S. cerevisiae* inkubiranim sa vanadilom i ustanovljeno je da su sposobne da akumuliraju milimolarne koncentracije ovog divalentnog katjona, vezanog za intracelularne molekule niske molekulske mase. Praćen je i signal ćelijski vezanog vanadila nakon inkubacije sa vanadatom na pH = 6 (*Bode et al., 1990*). Vanadat se ne može detektovati ovom metodom. Signal vanadila bio je prisutan već nakon 10 minuta inkubacije vanadatom, što bi moglo biti u skladu sa brзом ekstracelularnom redukcijom vanadata u vanadil (*Bode et al., 1990*). Pretpostavljena je i mogućnost da vanadat ulazi u ćeliju posredstvom anjonskog transportnog proteina, praćen intracelularnom redukcijom u vanadil (*Zoroddu and Masia, 1997*).

Primenom NMR (nuklearne magnetne rezonance), koja je pogodna za detekciju vanadata, mogu se odrediti različite forme vanadata, tj., razne monomerne i oligomerne vrste. Utvrđeno je prisustvo ćelijski vezanog vanadata, nakon inkubacije ćelija kvasca sa vanadatom, najčešće u formi dimera i dekamera (*Rehder, 2008*). Formiranje oligomernih vrsta verovatnije je u ćelijskom zidu s obzirom na povišenu kiselost, koju kvasci mogu da obezbede u zidu uprkos puferu, s obzirom na delovanje membranske protonske pumpe.

U slučaju *Hansenula polymorpha* (kvasac, filum Ascomycota) pretpostavljeno je da se redukcija vanadata u vanadil događa kao deo procesa detoksikacije, tako što se nakon redukcije u citoplazmi vanadil vezuje za polifosfate u vakuoli (*Manazzu et al., 1997*).

Kada se radi o razdelu Zygomycota, za ispitivanje interakcije sa vanadijumom je odabrana vrsta *Phycomyces blakesleeanus* kao dobro okarakterisani model sistem u fiziološkim i biofizičkim istraživanjima. Primenom EPR spektroskopije utvrđeno je da *P. blakesleeanus* može da redukuje V(V), prisutan u milimolarnim koncentracijama do V(IV) (Žižić et al., 2013). Pokazano je da je redukcija najvećim delom enzimski proces koji se odvija ekstracelularno pomoću enzima sa fericijanid reduktaznom aktivnošću (FeCNR) koji kao kofaktor sadrži Mo – MPT (molibden - molibdopteridat) kompleks i nalazi se na ekstracelularnoj površini ćelijske membrane, dok se manji deo vanadata redukuje intracelularno, posredstvom tiolnih jedinjenja. Pomenuti enzim je sličan NAD(P)H zavisnoj nitrat reduktazi izolovanoj iz *S. cerevisiae* (Barbier et al., 2005).

EPR istraživanja na *P. blakesleeanus* su pokazala da uz redukciju značajan udeo u interakciji V(V) u milimolarnim koncentracijama sa micelijumom ima i njegova adsorpcija na ćelijski zid, dok do usvajanja u ćeliju dolazi tek pri koncentracijama višim od 7 mM, kada je kapacitet gljive za redukciju i adsorpciju na ćelijski zid prevaziđen (Žižić et al., 2013).

Haloperoksidaze

Kao i kod pojedinih bakterija i algi, i među gljivama postoje one kod kojih vanadijum predstavlja komponentu prostetične grupe enzima peroksidaza. Vanadat – zavisne haloperoksidaze katalizuju vezivanje halogena na specifična mesta u organskim molekulima, akceptorima. *S. cerevisiae*, *Curvularia inaequalis* (Van Schijndelet et al., 1993) i *Botrytis cinerea* (Bar - Nun et al., 2002) sadrže vanadat zavisnu hloroperoksidazu, a kopnena vrsta lišaja *Xanthoria parietina* (Plat et al., 1987) vanadat - zavisnu bromoperoksidazu. Obe navedene vrste gljiva su biljni patogeni čije vanadat - zavisne hloroperoksidaze u reakciji dvoelektronske oksidacije Cl⁻ ubrzavaju sintezu hipohlorne kiseline, koja verovatno degradacijom ćelijskog zida biljke domaćina omogućava prodor gljiva u nju.

Za vanadat zavisnu hloroperoksidazu *C. inaequalis* je pokazano da ispoljava antimikrobnu aktivnost, npr., protiv intestinalne bakterije *Enterococcus faecalis* (Persoon et al., 2012).

Štaviše, bazofilni mutant vanadat zavisne hloroperoksidaze ima široku antimikrobnu aktivnost protiv Gram – pozitivnih i Gram – negativnih bakterija, a ispoljava i antivirusnu aktivnost (*Renirie et al., 2008*).

1. 3. Moguća primena vanadijuma u medicini

Kao što je već rečeno, sličnost između vanadata i fosfata pruža mogućnost supstitucije fosfata vanadatom u fiziološkim procesima, kako onim koji su zavisni, tako i onim koji su regulisani od strane fosfataza, kinaza, fosfomutaza, diesteraza, ATPaza, ribonukleaza (*Rehder, 2015*).

U tzv. medicinskom PSE, (*Barry and Sadler, 2013*), V je obeležen belom bojom (Slika 1. 4), što znači da ga autori smatraju esencijalnim za čoveka.

Ono što je podstaklo na brojne studije o farmakološkim efektima vanadijuma i njegovih koordinacionih jedinjenja sa organskim ligandima - koordinacija se ostvaruje preko atoma kiseonika, azota i sumpora - prevashodno na animalnim laboratorijskim modelima, jeste činjenica da pojačavaju efekat dejstva insulina (*Willsky et al., 2011*).

Vanadijum ispoljava i sposobnost modulacije signalnih puteva u B i T limfocitima, kao i mehanizma supresije inflamacije, a takođe i aktivacije pojedinih interleukina, uključujući IL – 2, IL – 4, IL – 6 i IL – 10, što ga čini dobrim potencijalnim kandidatom u procesu razvoja imunoterapeutika za tretman imunih poremećaja (*Tsave et al., 2016*).

H																	He	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn	
Fr	Ra	Ac	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt										
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		

Slika 1. 4. Medicinski periodni sistem. Beli simboli označavaju elemente esencijalne za čoveka. Zelena polja predstavljaju medicinske radioizotope, plava elemente koji se trenutno koriste u terapiji, narandžasta elemente koji se koriste u dijagnostici (Barry and Sadler, 2013).

Prvi klinički pokušaji primene jednostavnih neorganskih jedinjenja vanadijuma kod osoba sa dijabetesom sprovedeni su devedestih godina XX veka (Goldfine et al., 1995; Cohen et al., 1995; Willsky et al., 2001). Naprednije kliničke studije, koje se odnose na testiranje faze IIa sprovedene su skorije, primenom VO^{2+} - maltolat kompleksa sa efektom poboljšanja dejstva insulina (Thomson et al., 2009).

Treba napomenuti da vanadijum i njegova jedinjenja još uvek nisu našla adekvatnu primenu u medicini i farmaciji, između ostalog i zbog toga što podležu barem parcijalnoj biotransformaciji u telesnim tečnostima tokom farmakokinetičkog procesa, te primenjena supstanca nije nužno i farmaceutske aktivna. Takođe, utvrđivanje uloge pojedinih esencijalnih elemenata, uključujući vanadijum, u terapiji i kontroli homeostaze otežano je i činjenicom da se malo zna o njihovoj prirodnoj biohemiji i metabolizmu (Barry and Sadler, 2013).

1. 4. Vanadijum u ćelijskoj membrani

Insulin mimetička svojstva vanadijuma tiču se dalje njegove funkcije u procesima koji se izučavaju u okviru fenomenâ karakterističnih za ćelijske membrane: transporta glukoze, transporta jona i aminokiselina, metabolizma glikogena i lipida (*Stern et al., 1993*). Takođe, pokazano je, u *in vitro* studijama, da vanadat snažno inhibira aktivnost $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaze}$, kao i $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPaze}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPaze}$ (*Bakás et al., 2001*). Isti autori smatraju da vanadat utiče i na promenu membranskog potencijala, što za posledicu ima pojačan efekat glukoze na oslobađanje insulina. Konačno, Bakás i saradnici su pokazali i efekat vanadijumovih jedinjenja na promenu strukture lipidnog dvosloja ćelijske membrane, koja za posledicu može da ima i promenu funkcije, kako integrisanih, tako i perifernih membranskih proteina.

Što se tiče interakcije vanadijuma sa enzimom fericijanid reduktazom, čije je postojanje, kao što je već pomenuto, pokazano na ćelijskoj membrani ćelija micelijuma *P. blakesleeanus* (*Baroja – Mazo et al., 2004*), ovaj enzim bi mogao biti odgovoran za redukciju tetravanadata (V4) (*Žižić et al., 2013*).

Među najnovijim istraživanjima efekata vanadijuma na ćelijsku membranu je i *in vivo* ispitivanje ponašanja pacova tretiranih natrijum metavanadatom (*García et al., 2015*). Tretirane životinje su ispoljile poremećaj u pogledu lokomocije, a nakon imunohistohemijskih analiza MBP – a (*eng., myelin basic protein*) sprovedenih na presecima različitih delova mozga nakon žrtvovanja tretiranih životinja, pokazana je smanjena gustina mijelinizovanih nervnih vlakna. Pretpostavljeno je da je mijelin u CNS – u verovatno glavna meta peroksidacije lipida posredovane vanadatom.

1. 5. Polarografska ispitivanja vanadijuma

Još u prošlom veku primenom elektrohemijske tehnike, polarografije sa kapljućom Hg - elektrodom, proučavan je mehanizam redukcije jona vanadijuma (V) iz kiselih i jako alkalnih i amonijalkalnih rastvora (*Zeltzer, 1932*). Proučavanju mehanizma redoks procesa

različitih oksidacionih stanja vanadijuma iz osnovnih elektrolita različitog sastava i pH, kao i primeni dobijenih rezultata u analitičke svrhe posvećen je nemali broj publikacija (*Lingane, 1945; Kolthoff and Lingane, 1946; Filipović, et al., 1953; Lingane and Meites, 1948*). Pored brojnih radova koji proučavaju mehanizam redoks procesa jona vanadijuma na živinoj kapljućoj elektrodi, u nekompleksirajućim sredinama različitog pH, veći broj publikacija posvećen je i ispitivanju vanadijumovih kompleksa sa različitim ligandima, (*Coşkun et al., 2015; Biermann and Wong, 1963; Khan et al., 2006*). Polarografija, zahvaljujući senzitivnosti i selektivnosti, našla je primenu i u utvrđivanju rasprostranjenosti vanadijuma (*Puri et al., 1998; Rojas – Romo et al., 2016*).

1. 6. Toksični efekti vanadijuma

Vanadinit se ne javlja samo kao mineral već se akumulira i u olovnim cevima za vodu (*Gerke et al., 2009*). Ova činjenica, sama po sebi, nije problematična, s obzirom da je vanadinit nerastvorljiv u vodi. Međutim, u slučaju povišene kiselosti i viška fosfata dodatih vodi za piće, oslobađa se vanadat. S obzirom da vanadat u određenoj koncentraciji može biti toksičan, ovo je potencijalni i još uvek nerešen problem u oblastima i domaćinstvima u kojima se vodosnabdevanje još uvek vrši posredstvom olovnih cevi (*Rehder, 2013*). Takođe, pri sagorevanju uglja i lož ulja oslobađaju se oksidi vanadijuma, koji, pored toga što bivaju apsorbovani od strane čestica prašine, katalizuju oksidaciju SO₂ u SO₃, a zatim i H₂SO₄, te predstavljaju rizik po zdravlje i životnu sredinu (*Rehder, 2008*).

Mehanizam kojim vanadat ostvaruje svoje toksične efekte na biološke sisteme još uvek nije sasvim jasan i uglavnom se pripisuje različitim intracelularnim „ciljnim molekulima“, kao i promenama u pogledu hemijske forme i oksidacionih stanja kojima podleže, kako ekstracelularno tako i unutar same ćelije (*Manazzu et al., 2000*).

Što se tiče toksičnih efekata na gljive, prema poznatim podacima, vanadat je toksičniji u odnosu na vanadil po *S. cerevisiae* (*Manazzu et al., 1997; Zorrodo et al., 1996*) i *H. polymorpha*, kod koje je prevođenje u vanadil čak sredstvo detoksikacije (*Manazzu et al., 2000*). Međutim, kad se radi o *P. blakesleeanus*, pokazano je upravo suprotno – V(IV) je

toksičniji jer inhibira razvoj micelijuma već pri koncentraciji od 0.5 mM, dok V(V) stimuliše razvoj do koncentracije od 5 mM (Žižić *et al.*, 2013).

1. 7. Gljive u bioremedijaciji

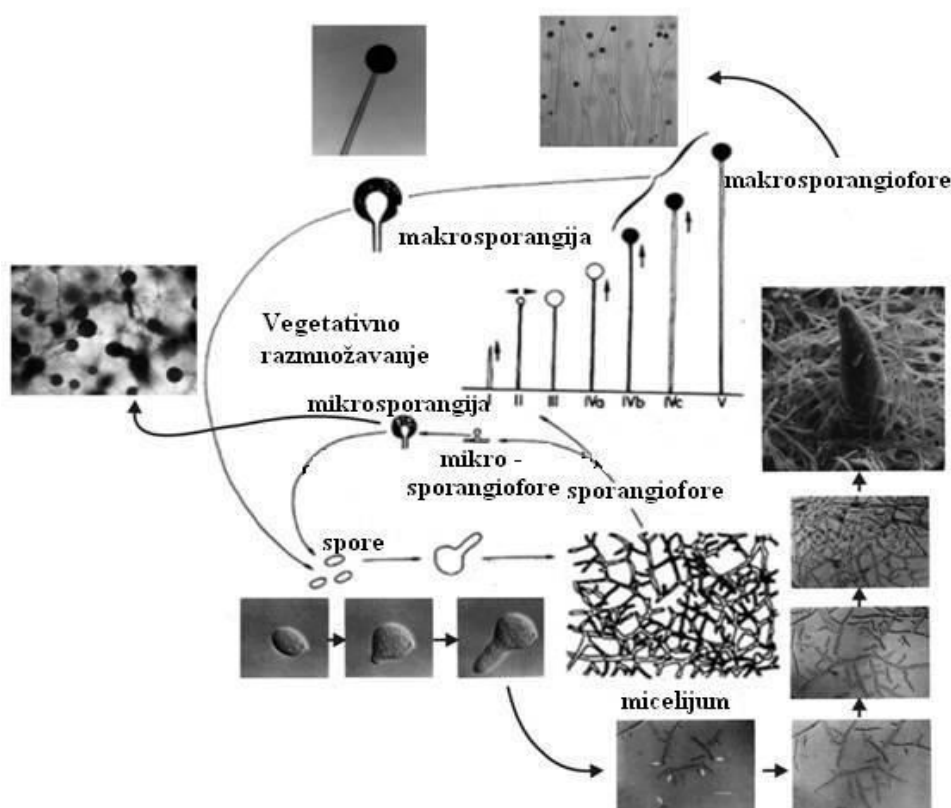
Gljive, prevashodno filamentozne, koje imaju visok odnos površine i mase, predstavljaju integralnu bioaktivnu komponentu procesa kruženja metala i drugih elemenata – ugljenika, sumpora, fosfora i azota – u prirodi (Gadd and Sayer, 2000). Ovo se prevashodno odnosi na uslove povišene kiselosti u kojima je povećana mobilnost toksičnih metala (Morley *et al.*, 1996). Metali i njihova jedinjenja, derivati, kao i radionuklidi interaguju sa gljivama na različite načine, zavisno od vrste metala, vrste gljive, kao i uslova okoline. Solubilizacija i imobilizacija od strane gljiva su osnovne komponente biogeochemijskog ciklusa toksičnih metala, pri čemu su oni direktno i indirektno uključeni u sve aspekte rasta, fiziologije i morfogeneze samih gljiva.

Među mehanizmima transformacije metala, metaloida i organometalnih jedinjenja u manje toksične forme, a u kojima učešće uzimaju gljive – nekoliko vrsta jednoćelijskih i filamentoznih - su redukcija, metilacija i dealkilacija. Tokom rasta gljiva na medijumu koji je sadržao srebro nitrat, redukcija Ag(I) u Ag(0) manifestovala se u vidu crnih kolonija u čijim se ćelijskim zidovima taložilo elementarno srebro (Kierans *et al.*, 1991). Takođe, iz ćelijskog zida *Debaryomyces hansenii* izolovani su, kako enzimski tako i neenzimski Cu(II) – redukujući sistemi, pri čemu je enzimski uključen u kontrolu procesa unosa Cu(II) (Wakatsuki *et al.*, 1991a; Wakatsuki *et al.*, 1991b). Danas se, zapravo, zna da procesi redukcije, kako Cu(II) u Cu(I), tako i Fe(III) u Fe(II), primera radi, predstavljaju glavni preduslov za visoko afinitetni transport ovih metala (Kosman, 1994; Lesuisse and Labbe, 1995; Eide and Guerinot, 1997). Pokazana je i redukcija Hg(II) u Hg(0) od strane gljiva (Yannai *et al.*, 1991). Jasnije je pokazana sposobnost gljiva da redukuju metaloide. Redukciju selenata i selenita do elementarnog selenijuma mogu da vrše brojne vrste gljiva. Taloženje elementarnog selenijuma uočljivo je u vidu crvenih kolonija (Ramadan *et al.*, 1988). Primenom transmisiona elektronske mikroskopije u vakuolama ćelija *Fusarium* sp. i *Penicillium citrinum* uočene su krupne crne granule elementarnog telura, nastalog

redukcijom telurita (*Gharieb et al., 1999*). I kad je reč o vanadijumu, s obzirom da je primarni način ulaska ovog prelaznog metala u ekosistem upravo preko gljiva, one mogu smanjiti njegovu toksičnost putem sinteze organometalnih kompleksa, dok pojedine koriste dominantne oblike skladištenja fosfora, polifosfate, u detoksikaciji organizma u prisustvu toksičnog oblika vanadijuma, vanadata (*Žižić, 2013*).

1. 8. Biologija vrste *Phycomyces blakesleeanus*

P. blakesleeanus je jedna od tri vrste roda *Phycomyces*, jedinog predstavnika familije Phycomycetaceae iz reda Mucorales, pripadnika jedne od dveju klasa – Zygomycetes - filuma Zygomycota. Druga klasa je Trichomycetes.



Slika 1. 5. Vegetativni životni ciklus *P. blakesleeanus* (*Živić, 2005; preuzeto uz saglasnost autora; modifikovano*).

Kao pripadnika klase Zygomycetes rod *Phycomyces* karakterišu vegetativne, nepokretne spore, bez flagela, što je njegove vrste adaptiralo na saprofitni terestrijalni način života. Druga značajna karakteristika je cenocitični micelijum, skoro sasvim celovit, bez septi. Kao predstavnike reda Mucorales odlikuje ih prisustvo sporangija, odnosno endogeni razvoj spora.

Pored toga što nastanjuje zemljište, pogodni supstrati za ovu gljivu su i masne podloge – prazni bareli nafte, deponije, organski supstrati u raspadanju...

P. blakesleeanus ima dva životna ciklusa: polni, tokom kojeg se formiraju zigospore, veličine 0.5 mm, koje služe za preživljavanje nepovoljnih uslova, i bespolni, čije su spore – sporangiospore - manje otporne na nepovoljne uslove, veličine oko 10 µm, sa ulogom u efikasnoj masovnoj disperziji pri nepovoljnim uslovima sredine. Vegetativne spore su pojedinačne, elipsoidne, nepokretne ćelije sa nekoliko nukleusa i debelim ćelijskim zidom. U uslovima nepovoljnim za rast, ostaju u stanju mirovanja, pri čemu im niska metabolička aktivnost omogućava dugotrajno preživljavanje. Pri povoljnim, prevashodno nutritivnim okolnostima, spore počinju da klijaju, pod mikroskopom se uočavaju promene – postaju nabrekle, povećavaju svoju zapreminu i menjaju oblik u sferični. Ubrzo zatim izdužuju se u germinativne cevi, gradeći prve hife. Nukleusi počinju da se dele i pre pojave germinativnih cevi, raspoređuju se po celoj rastućoj ćeliji i postaju manje upadljivi (*Bergman et al., 1969*). Nakon germinacije i pojave prvih hifa, počinje njihov brzi rast i grananje, što dovodi do nastanka i izrastanja micelijuma, iz kojeg nakon 2 – 3 dana započinje rast sporangiofora. Vegetativni životni ciklus predstavljen je na Slici 1. 5.

Sporangiofore su uspravne hife koje na svom vrhu nose sporangije. Sporangiofora najpre „izranja“ iznad površine supstrata kao malo čvršća tamnija hifa i izdužuje se usled istezanja ćelijskog zida u apikalnom regionu. Zatim se elongacija zaustavlja i vrh nabubri, formirajući sporangiju sferičnog oblika. Sporangija je najpre svetlo žuta, usled prisustva β – karotena, a zatim postaje crna jer karoten podleže oksidativnoj polimerizaciji gradeći tzv. sporopolenin, jedinjenje otporno na hemijsku i biološku degradaciju. Unutar sporangija protoplazma se povlači, ostavljajući prostor za približno 100000 sporangiospora, od kojih

svaka ima po nekoliko nukleusa. Zidovi sporangiospora takođe sadrže sporopolenin. Mada najveći deo sporangije zauzimaju spore, sporangiofora prodire u nju, čineći tzv. kolumelu. Nakon formiranja sporangija, izduživanje sporangiofora prestaje, izuzev istežanja u zoni rasta, neposredno ispod sporangije. Zid sasvim sazrelih sporangija je tanak i lako prska, oslobađajući spore (*Carlile et al., 2001*).

Za sporangiofore, u svim fazama rasta, karakteristično je da su osetljive na bar četiri različita stimulusa: svetlost, gravitaciju, istežanje i jedan nepoznati stimulus koji im omogućava da zaobilaze čvrste objekte (*Bergman et al., 1969*). Ovaj poslednji, „stimulus izbegavanja“ označen je i kao fugitropizam, ali mehanizam koji stoji u njegovoj osnovi još uvek je nerazjašnjen (*Webster and Weber, 2007*).

2. CILJ RADA

S obzirom da vanadijum, kako usled antropogenog uticaja, tako i lakim oslobađanjem iz svojih prirodnih resursa, dospeva u životnu sredinu, ponekad u visokim, toksičnim koncentracijama, a s druge strane, proces redukcije metala, prevashodno u pojedinim gljivama, predstavlja jedan od mehanizama detoksikacije, od izuzetnog je značaja ispitivanje redukcije, pre svega petovalentnog oblika ovog prelaznog metala, u pogodnim model sistemima, kakav je gljiva *P. blakesleeanus*. Rezultati, dobijeni primenom EPR i ^{51}V NMR metoda, na ovu temu postoje, ali su dobijeni za relativno visoke koncentracije vanadata ($> 2 \text{ mM}$) koje su malo verovatne u životnoj sredini i pri kojima se očekuje veći stepen polimerizacije vanadata u odnosu na submilimolarne koncentracije, gde se očekuje dominacija monomera. Stoga su pred ovu disertaciju postavljeni specifični ciljevi:

1. Kombinacijom polarografije, EPR i ^{51}V NMR metoda ustanoviti da li micelijum redukuje vanadat i u submilimolarnim koncentracijama.
2. Kombinacijom polarografije, EPR, ^{51}V NMR i biohemijskih metoda utvrditi mehanizam eventualne redukcije V(V) u submilimolarnim koncentracijama od strane micelijuma gljive, sa posebnim naglaskom na učešće enzima sa fericijanid reduktaznom aktivnošću koji se pokazao kao dominantan u redukciji V(V) u milimolarnim koncentracijama.
3. Korišćenjem polarografije i ^{51}V NMR metode utvrditi da li pri submilimolarnim koncentracijama V(V) dolazi do njegove adsorpcije na ćelijski zid, za koju je pri milimolarnim koncentracijama V(V) utvrđeno da je značajan mehanizam interakcije micelijuma sa vanadatom.
4. Korišćenjem ^{51}V NMR metode utvrditi oblik vanadata koji micelijum usvaja.
5. Primenom ^{51}V NMR odrediti vrste V(V) koje se akumuliraju u ćeliji, kako pri visokim, tako i pri niskim koncentracijama vanćelijskog V(V).
6. Ramanskom spektroskopijom definisati najzastupljenije interakcije vanadijuma sa biomolekulima u micelijumu gljive *P. blakesleeanus*.

3. MATERIJAL I METODE

Za istraživanje fizioloških procesa Zygomycota, *P. blakesleeanus* se nameće kao dobar izbor zbog jasno definisanih uslova gajenja, kratkog životnog ciklusa, makroskopske veličine sporangiofora i postojanja velikog broja mutanata za različite fiziološke procese (Cerdá - Olmedo and Lipson, 1987). Eksperimentalni objekat u ovom radu bio je divlji soj NRRL1555 (-) *P. blakesleeanus* (Burgeff).

3. 1. Uzgoj spora

Vegetativne spore *P. blakesleeanus* čuvaju se u zamrzivaču na temperaturi – 20° C, u koncentraciji 10⁷ spora / ml. U cilju obezbeđivanja zaliha, sade se na čvrsti krompirov medijum.

Neposredno pre zasejavnja – da bi se aktivirao proces klijanja - spore su razblaživane do koncentracije 10² spora / ml i inkubirane u vodenom kupatilu 15 min. na temperaturi od 49° C. Krompirov medijum pripreman je na sledeći način: 200 g krompira kuvano je u 1 l destilovane vode, zatim ceđeno kroz dvoslojnu gazu, a zapremina filtrata dopunjavana do zapremine od 1 l; filtrat je ponovo zagrevan do ključanja, pri čemu je u njega dodavano 15 g agara, 20 g glukoze, 1 mg vitamina B1 i 1.5 g ekstrakta kvasca. Dobijeni medijum je autoklaviran 35 min. na 105° C, zatim, u sterilnim uslovima, razlivan u Petri ploče prečnika 9 cm, do visine 4 – 5 mm. Nakon hlađenja, u svaku Petri ploču dodavano je 100 µl aktiviranih spora i staklenim štapićem ravnomerno razmazivano po površini medijuma, nakon čega su Petri ploče poklapane. Spore su gajene u komori za uzgoj, u navlaženim plastičnim kutijama, na temperaturi od 22° C, pri relativnoj vlažnosti vazduha 95 %, izložene dejstvu belog fluorescentnog osvetljenja jačine 10 W / m². Nakon 48 h Petri ploče su otvarane da bi se omogućio rast sporangiofora, a nakon 96 h i dostizanja poslednjeg stadijuma razvića, zrele sporangiofore su potapane u destilovanu vodu, pri čemu su opne sporangija pucale i spore oslobađane. Konačna zapremina rastvora spora određivana je množenjem broja inokuliranih Petri ploča sa 1.4, što je omogućavalo dobijanje osnovnog rastvora spora koncentracije 10⁷ spora / ml.

3. 2. Uzgoj micelijuma

U skladu sa zahtevima eksperimenata spore su inkubirane u vodenom kupatilu 15 min. na temperaturi od 49° C, da bi se aktivirao proces njihovog klijanja, a zatim zasejavane u standardni tečni minimalni medijum (*Sutter, 1975*), sastava: 36.7 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄ x 7H₂O, 0.376 mM CaCl₂, 3 µM tiamin x HCl, 1 µM limunska kiselina x H₂O, 3.7 µM Fe(NO₃)₃ x 9H₂O, 3.5 µM ZnSO₄ x 7H₂O, 1.8 µM MnSO₄ x H₂O, 0.2 µM CuSO₄ x 5H₂O, 0.2 µM Na₂MoO₄ x 2H₂O. Minimalni medijum je autoklaviran 35 min. na 105° C, a nakon hlađenja nalivano je po 60 ml medijuma i 3 ml aktiviranih spora u erlenmajere zapremine 100 ml, tako da je konačna koncentracija spora u medijumu bila približno 10⁶ spora / ml. Erlenmajeri, zatvoreni poroznim zapušačima postavljani su na mešalicu u komori za uzgoj, posredstvom pumpi za kiseonik uzorcima u medijumu je omogućavana kontinuirana oksigenacija, a obezbeđivano je i kontinuirano fluorescentno belo osvetljenje jačine 10 W / m². Temperatura u komori iznosila je 20° C. Uzgoj je trajao 24 h ili 28 h, zavisno od potreba eksperimenta.

Za potrebe pojedinih eksperimenata korišten je osnovni rastvor spora pripreman uzgojem vegetativnih spora na čvrstom medijumu koji je sadržao 3 % agar, a bez krompira kao eventualnog izvora molibdena. Takođe, standardni minimalni medijum menjan je utoliko što je njegov sastavni deo, rastvor mikroelemenata neophodnih za rast micelijuma, pripreman bez molibdena.

3. 3. Izolacija ćelijskog zida

Ćelijski zid je izolovan iz micelijuma starog 28 h, uzgojenog u standardnom minimalnom medijumu. Pre homogenizacije micelijum je ispran, a tečnost izvučena na vakuum pumpi. Homogenizacija micelijuma vršena je u puferu koji je sadržao 50 mM TRIS – HCl, 50 mM NaCl i 0.05 % Triton X – 100, pH vrednosti 7.2. Odnos mase micelijuma i zapremine medijuma za homogenizaciju iznosio je 1:2 do 1:5 (u različitim izolacijama). Homogenat je dobijen upotrebom *Polytron homogenizer – a (Kinematica)*, homogenizacijom 3 x 5 sekundi u posudi od pleksiglasa, nakon čega je filtriran kroz četvoroslojnu gazu i

centrifugiran 15 minuta na 1000 g. Pelet je zatim resuspendovan u puferu za ispiranje, pH = 7.2, koji je sadržao 50 mM TRIS – HCl i 50 mM NaCl i centrifugiran 15 minuta na 1000 g. Pelet je resuspendovan u 50 mM TRIS – HCl, pH = 7.2 i ponovo centrifugiran 15 minuta na 1000 g, pri čemu je poslednji postupak ponavljan 3 puta. Talog dobijen nakon trećeg ispiranja korišten je u eksperimentima ispitivanja sposobnosti ćelijskog zida da adsorbuje / redukuje vanadat.

3. 4. Izolacija ćelijske membrane

Polazni materijal za izolaciju membranskih frakcija bio je 28 h star micelijum uzgojen u standardnom minimalnom medijumu. Nakon što je minimalni medijum ispran i tečnost izvučena na vakuumu, vršena je homogenizacija u medijumu koji je sadržao 0.6 M saharozu, 10 mM HEPES / KOH, pH = 7.5 i 5 mM askorbat. Odnos mase micelijuma i zapremine medijuma bio je 1:2. Tkivo je homogenizovano tučkom u avanu ili primenom *Polytron homogenizer – a (Kinematica)*, homogenizacijom 3 x 5 sekundi u posudi od pleksiglasa. Nakon toga je filtriran kroz četvoroslojnu gazu i centrifugiran 10 minuta na 10000 g. Pelet je odbacivan, a supernatant centrifugiran na ultracentrifugi 40 minuta na 100000 g. Ovako dobijeni supernatant sadrži ukupne solubilne proteine, dok se u talogu nalaze mikrozomi – fragmenti svih ćelijskih membrana.

3. 4. 1. Razdvajanje na dvofaznom sistemu

Dvofazni sistem predstavlja mešavinu polimera koji su rastvorljivi u vodi ali se međusobno ne mešaju. Prema svojim površinskim karakteristikama različite membrane se raspoređuju u donju ili gornju fazu sistema. Na afinitet membrana prema nekom od slojeva utiče koncentracija polimera, jonska jačina i sastav dvofaznog sistema.

Razdvajanje ćelijske membrane od unutarćelijskih membrana vršeno je metodom (*Kjellbom i Larsson, 1984*), prilagođenoj svojstvima našeg biološkog objekta. Talog mikrozoma je nakon ultracentrifugiranja resuspendovan u rastvoru sledećeg sastava: 0.33 M saharoza, 5 mM K – fosfatni pufer (KH_2PO_4), pH = 7.8 i 3 mM KCl. Zatim je 3 g suspenzije

mikrozoma nanošeno na 9 g unapred pripremljenog dvofaznog sistema tako da je finalni sastav dvofaznog sistema bio: 0.33 M saharoza, 6.5 % dekstran, 6.5 % PEG, 5 mM K – fosfatni pufer, pH = 7.8 i 3 mM KCl. Dvofazni sistem za prečišćavanje istog sastava je pripremljen u levku za odvajanje dan ranije; nakon pripreme su gornja (U) i donja (L) faza razdvojene u zasebne čaše i čuvane na + 4 °C. Epruveta sa uzorkom na dvofaznom sistemu je mešana okretanjem 30 – 40 puta, a zatim centrifugirana 5 minuta na 2500 g, da bi se ubrzalo razdvajanje faza. Nakon toga je 90 % gornje faze pažljivo usisavano Pasterovom pipetom, prebacivano u novu epruvetu i dopunjavano (do ukupne mase od 6 g) svežom U fazom, a zatim (do ukupne mase od 12 g) svežom L fazom. Postupak prečišćavanja je ponavljan tri puta.

L1 (prva donja) faza sa graničnim slojem, razblažena je puferom za ispiranje koji je sadržao 5 mM K – fosfatni pufer, pH= 7.8 i 0.25 M saharozu, i centrifugirana 40 minuta na 100000 g. Na isti način je tretirana i U_{fin} (finalna gornja) faza. Supernatanti su odliveni a talozi - mikrozomalne frakcije iz L1 i ćelijske membrane iz U_{fin} faze su resuspendovani u puferu za ispiranje i još jedanput centrifugirani 40 minuta na 100000 g.

Finalni talozi mikrozomalnih frakcija i ćelijske membrane resuspendovani su u medijumu za resuspendovanje membrana koji je istog sastava kao pufer za ispiranje, s tim što sadrži i 10 % glicerina, i zamrznuti na – 60° C do analize.

Mikrozomalna frakcija korišćena je za poređenje i procenu kontaminacije plazma membranske frakcije drugim ćelijskim komponentama.

3. 4. 2. Razdvajanje na saharoznom gradijentu

Alternativni način prečišćavanja ćelijske membrane je centrifugiranjem uzorka kroz saharozni gustinski gradijent. Ova metoda je češće korišćena za izolaciju membrana gljiva i animalnih ćelija nego prečišćavanje na dvofaznom sistemu. Za dobijanje ćelijske membrane prečišćene na gustinskom saharoznom gradijentu korišćena je modifikovana

metoda Marriott - a, 1975. Talog dobijen nakon prvog ultracentrifugiranja resuspendovan je u 15 % rastvoru saharoze u 5 mM HEPES / KOH – u, pH = 7.5, a zatim nanesen na unapred pripremljen saharozni gradijent (50 % - 40 % - 30 % - 15 % saharoze u 5 mM HEPES / KOH, pH = 7.5). Gradijent sa uzorkom u okviru gornjeg sloja 15 % saharoze je centrifugiran 90 minuta na 104000 g, u „swing – out“ rotoru. Nakon centrifugiranja, pažljivo su Pasterovom pipetom usisani rastvori sa granica slojeva 50 % - 40 %, 40% - 30 % i 30 % - 15 %, razblaženi u puferu za ispiranje sastava 5 mM HEPES / KOH, pH = 7.5 i 0.25 M saharoza, i centrifugirani 40 minuta na 100000 g. Talози sa različitim membranskim frakcijama resuspendovani su u medijumu za resuspendovanje membrane, zamrzavani u tečnom azotu i čuvani na – 60° C do analize.

3. 5. Priprema rastvorā

Rastvor natrijum ortovanadata (200 mM) pripreman je prema metodi Gordon - a (*Gordon, 2001*). U vodi je rastvoren Na_3VO_4 u potrebnoj koncentraciji i rastvor je zagrevan do ključanja. Nakon hlađenja, pH mu je podešavan na 10, upotrebom NaOH. Pri pH = 10 rastvor postaje žut usled polimerizacije monomera u dekamere vanadata. Ponovnim zagrevanjem do ključanja rastvor se obezbojava, a ponovnim dodavanjem NaOH nakon hlađenja, pH je podešavan na 10, pri čemu je primetno manje odstupanje pH nakon kuvanja u odnosu na prethodno. Žuta boja se gubi ponovnim kuvanjem, a postupak se ponavlja do potpune stabilizacije pH rastvora. Dobijeni osnovni rastvor je podeljen nalivanjem u plastične „ependorfice“ zapremine 1 ml i čuvan u zamrzivaču na temperaturi – 20° C do početka eksperimenata.

Rastvori $\text{VOSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i CdCl_2 pripremani su neposredno pred izvođenje eksperimenata, rastvaranjem u destilovanoj vodi u potrebnoj koncentraciji.

HEPES, u potrebnoj koncentraciji, rastvaran je u destilovanoj vodi a pH (7.2) mu je podešavan pomoću KOH.

U eksperimentima sa izolovanim ćelijskim zidom, masa ispitivanog uzorka je određivana tako što je 2 ml suspenzije gljive ceđeno na vakuum pumpi, a zatim je dobijena masa

micelijuma nakon ceđenja služila kao merilo: ista masa ćelijskog zida suspendovana je u 2 ml pufera.

3. 6. Polarografska merenja

Polarografija je odabrana kao selektivna, osetljiva, reproduktivna i neinvazivna metoda, što nam je omogućavalo praćenje uticaja živog organizma na oksido - redukcione procese u spoljašnjoj sredini. Takođe, polarografija zahteva malu količinu uzorka, koju je moguće svrsishodno tretirati niskim koncentracijama vanadata, tako da je on u radnom rastvoru prisutan u obliku monomera, za razliku od ranijih ispitivanja, gde je primena spektroskopskih metoda zahtevala veće količine uzorka, pa time i više koncentracije vanadata. Ovo je, pored promene pH prilikom dodavanja vanadata, dovodilo i do njegove oligomerizacije, pa time i različitih interakcija sa micelijumom *P. blakesleeanus* u odnosu na monomer.

U istraživanju su korišćene dve polarografske metode: polarografija jednosmerne struje (DCP, eng., *direct current polarography*) i diferencijalna pulsna polarografija (DPP, eng., *differential pulse polarography*). Za DCP i DPP analizu korišćen je *Princeton Applied Research 174 A* potenciostat opremljen *Houston instrument, Omnigraphic 2000 X – Y* pisačem.

Elektrohemijska ćelija zapremine 30 ml opremljena je radnom kapljućom živinom elektrodom (eng., *DME, dropping mercury electrode*) konstante kapilare (m) 2.5 mg / s, pri visini živinog stuba od 45 cm. Vreme kapljanja žive za sve eksperimente bilo je podešeno na 1 kap u sekundi. Zasićena kalomelova elektroda (SCE) i platinska elektroda korišćene su kao referentna i pomoćna elektroda. Brzina snimanja polarografskih krivih bila je 10 mV/ s. Strujne oscilacije u DCP eksperimentima su prigušivane primenom nisko propusnog filtera (eng., *lpf, low pass filter*) potenciostata pozicioniranog na 3 s. Početni potencijali, kao i strujni opsezi podešavani su u skladu sa zahtevima svakog pojedinačnog merenja. Na početku svakog eksperimenta rastvor u elektrolitičkoj ćeliji je deoksigenisan uvođenjem azota u trajanju od po 5 minuta.

Kontrolni DCP i DPP eksperimenti su izvođeni u 20 ml pufera (10 mM HEPES – a, pH = 7.2). U eksperimentima sa micelijumom gljive, 18 ml pufera je mešano sa 2 ml suspenzije 24 h starog micelijuma. Ovakva smeša je sadržala oko 50 mg sveže mase (sm) micelijuma dajući konačnu koncentraciju micelijuma u elektrohemijskoj ćeliji od 2.5 mg_{sm} / ml. HEPES pufer je odabran s obzirom na pogodan pKa (7.55) i zanemarljiv kapacitet za formiranje metalnih kompleksa, što omogućava vezivanje metala za površinu ćelije (*Savvaidis et al., 2003*). Natrijum ortovanadat, (Na₃VO₄ V(V)) je dodavan u opsegu koncentracija od 0.1 – 1.0 mM, dok su vanadil sulfat, (VOSO₄ V(IV)), kalijum fericianid, (kalijum - heksacijanoferrat(III), K₃[Fe(CN)₆]), kao i smeša V(V) i [Fe(CN)₆]³⁺ dodavani u opsegu koncentracija od 0.1 do 0.5 mM. Za opisivanje dobijenih polarografskih talasa korišćene su vrednosti granične difuzione struje, I_d (μA), polutalasnog potencijala, E_{1/2}, (mV) i konstante difuzione struje (I_k). I_k je određivana prema formuli (*Filipović et al., 1953*):

$$I_k = \frac{I_d}{Cm^{2/3}t^{1/6}},$$

gde je **m** – konstanta kapilare (mg / sec); **t** - vreme kapanja (s); **c** - koncentracija elektroaktivne vrste (M).

3. 7. NMR eksperimenti

⁵¹V NMR merenja izvođena su na *Apollo upgrade, Bruker MSL 400* spektrometru rezonantne frekvencije za ⁵¹V od 105.169 MHz. Dužina pulsa je bila 20 μs (45°), spektri su snimani 3.6 min., za neisprani micelijum i 36 min., za isprani micelijum i u slučaju niskih koncentracija vanadata. Vodeni rastvor 1M natrijum metavanadata, pH = 12 sa signalom VO₄³⁻ na – 535.7 ppm, u odnosu na VOCl₃ je korišćen je kao spoljašnji standarad za određivanje hemijskog pomaka V(V) signala (*Rehder, 2008*).

Za navedena merenja 24 h star micelijum je prikupljan pomoću vakuum filtracije i ispiran eksperimentalnim minimalnim medijumom (standardni minimalni medijum, bez fosfata i mikroelemenata). Zatim je 0.6 g micelijuma resuspendovano u aerisanom HEPES - u i

pakovano u male staklene fiole ukupne zapremine 1.9 ml. Natrijum ortovanadat je dodavan u finalnoj koncentraciji 4 $\mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$. Za eksperimente inhibicije preuzimanja i redukcije vanadata, fosfat, KH_2PO_4 je dodavan u finalnoj koncentraciji 36.7 mM, a CdCl_2 i $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ u koncentraciji 40 $\mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$. U svim eksperimentima sa ispranim micelijumom, pre snimanja spektara, tretirani micelijum je ispiran 5 puta destilovanom vodom pomoću vakuum filtracije.

Za potrebe pojedinih eksperimenata, standardnom minimalnom medijumu u kojem je micelijum kultivisan 24 h, dodavan je natrijum ortovanadat u koncentracijama 2, 5 i 7 mM.

3. 8. EPR eksperimenti

EPR spektri snimani su na temperaturi od 20 °C, na *Varian E – 104* spektrometru radne frekvencije 9.452 GHz (X – band), opsega polja 1000 G, modulacione amplitude 10 G, modulacione frekvencije 100 kHz, mikrotalasne snage 10 mW, vremenske konstante 64 ms i vremena snimanja uzorka 4 minuta.

Micelijum je resuspendovan u HEPES – u da bi se održala optimalna vrednost pH (7.2), zatim je tretiran 0.5 i 2.5 mM natrijum ortovanadatom i, nakon 35 min., uzorkovan vakuum filtracijom. Uzorci mase 30 g su smeštani na otvoreni teflonski držač i pristupano je snimanju spektara.

3. 9. Ramanska mikrospektroskopija

Ramanski spektri snimljeni su pomoću *DXR Raman mikroskopa (Thermo Scientific)*, primenom laserske ekscitacije talasne dužine 532 nm, konstantne snage 10 mW. Uzorak je nanošen na pozlaćene merne pločice *Gold EZ – Spot Micro Mounts for SERS (Thermo Scientific)*. Vreme ekspozicije bilo je 30 s, izvršeno je 10 ekspozicija.

24 h star micelijum filtriran je vakuum filtracijom i ispiranjem eksperimentalnim minimalnim medijumom. Natrijum ortovanadat je dodavan u finalnoj koncentraciji 80 $\mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$. Kontrolni i tretirani micelijum su nakon ispiranja resuspendovani u

dejonizovanoj vodi u odnosu 1:20 i držani na ledu do početka eksperimenta. Po 5 μ L suspenzije stavlja se na pločice.

3. 10. Biohemijske metode

Aktivnosti enzima određivane su spektrofotometrijski (*Shimadzu UV - Vis 1600*), u kvarenim kivetama zapremine 1 ml, ili na čitaču mikrotitar pločica, u pločicama od optičke plastike, zapremine bunarčića 0.4 ml, sa ravnim dnom. Prilikom merenja aktivnosti enzima u membranskim frakcijama, u reakcionu smešu je dodavan 1 % Triton X – 100.

Aktivnost citohrom c oksidaze je određivana prema *Tolbert (1974)*. Reakciona smeša je sadržala 50 mM TRIS, pH = 7.5 i 40 μ M citohroma c koji je neposredno pre početka merenja redukovan dodatkom nekoliko kristala $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Reakcija je započinjana dodavanjem uzorka i praćena preko promene apsorbance (oksidacije citohroma) na 550 nm.

Aktivnost NADPH - citohrom c reduktaze je određivana prema metodi Terry i Williams (2002), praćenjem redukcije citohroma preko povećanja apsorbance na 550 nm, pri čemu je reakciona smeša sadržala 3 mM KCN, 20 mM cyt c i 50 mM TRIS, pH = 7.5.

Aktivnost ATPaze određivana je prema Terry and Williams (2002) na čitaču mikrotitar pločica. Esej je baziran na merenju količine neorganskog fosfata oslobođenog hidrolizom ATP – a pomoću molibdatnog reagensa. Reakcijom neorganskog fosfata sa amonijum molibdatom dolazi do formiranja boje – molibdatno plave, čija je apsorbance merena na 620 nm. U reakcione smeše su dodavani inhibitori radi procene prisustva pojedinih membrana, i to natrijum ortovanadat za inhibiciju ATPaze ćelijske membrane, kalijum nitrat za inhibiciju ATPaze tonoplasta i natrijum azid za inhibiciju ATPaze iz membrane mitohondrija.

Aktivnost NADH – zavisne fericijanid reduktaze merena je prema metodi Kim i saradnika (2002). Reakciona smeša je sadržala 50 mM Tris - HCl, pH = 7.2, 0.01% Triton X - 100, 200 μ M NADH, 250 μ M $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ i 10 μ l uzorka ćelijske membrane; reakcija je

praćena preko promene (opadanja) apsorbance na 420 nm koja potiče od fericijanida. U pojedinim eksperimentima u reakcionu smešu je dodavan 1 mM, odnosno 10 mM V(V).

Koncentracija proteina je određivana po metodi *Bradford (1976)*, upotrebom goveđeg serum albumina kao standarda.

3. 11. Analiza podataka

Za prikaz i analizu podataka originalni polarogrami su digitalizovani primenom programa *PlotDigitizer 2. 6. 3.*, a potom analizirani u programu *SigmaPlot 11* (Systat Software Inc., USA).

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška. Statističko poređenje rezultata je vršeno primenom t – testa, sa nivoom značajnosti 5 % ($P < 0.05$). Zavisnosti koncentracije usvojenog V(V) od strane micelijuma - $c_{uV(V)}$ od koncentracije V(V) u medijumu - c , je opisana sigmoidom izraza:

$$c_{uV(V)} = \frac{c_{uV(V)max}}{1 - e^{-\frac{c - c_{0.5}}{b}}},$$

gde je $c_{uV(V)max}$ - maksimalna vrednost usvojenog V(V); $c_{0.5}$ - koncentracija V(V) u medijumu pri kojoj dolazi do polovine promene i b - nagib sigmoide. Sve statističke analize su vršene u programu *SigmaPlot 11* (Systat Software Inc., USA).

Statistička, analiza kad je reč o NMR i EPR eksperimentima je izvođena primenom *Mann - Whitney U* - testa na 5% nivoa značajnosti ($P \leq 0.05$) koristeći *SigmaStat* program *V2* (*Aspire Softwer International, Ashburn, VA, USA*).

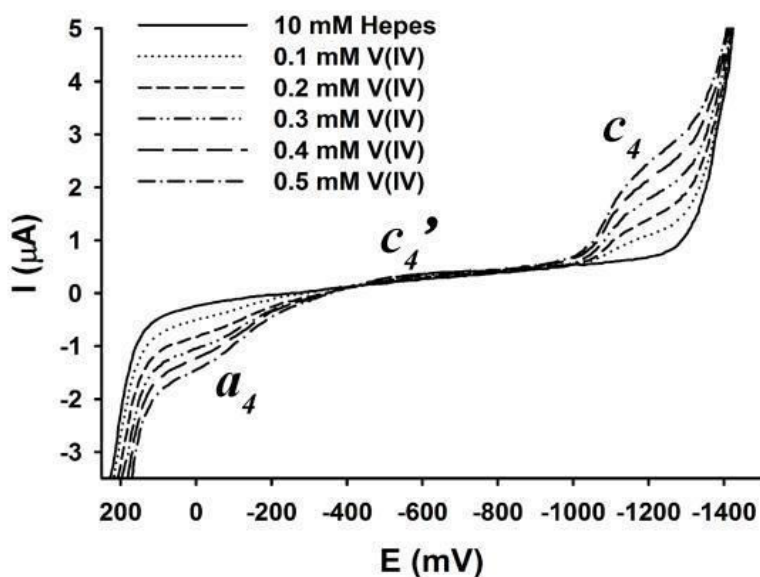
Podaci dobijeni ramanskom mikrospektroskopijom su analizirani upotrebom *OMNIC for Dispersive Raman* software – a (verzija 8. 1. 42), a predstavljeni su kao srednja vrednost \pm standardna greška, ($n = 12$). Statističko poređenje rezultata je vršeno primenom t – testa, sa nivoom značajnosti 5 % ($P < 0.05$).

4. REZULTATI

4. 1. Polarografska ispitivanja

4. 1. 1. Polarografska svojstva vanadila i vanadata u puferu

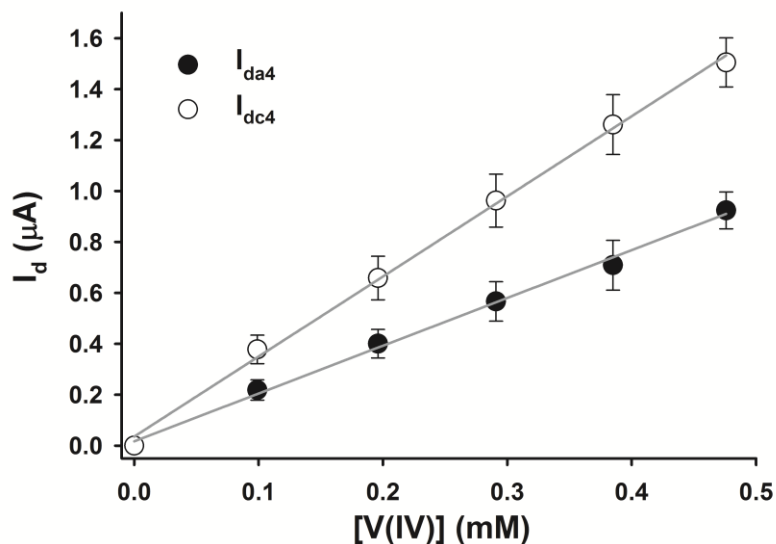
Polarografske krive vanadila V(IV) u opsegu koncentracija 0.1 mM – 0.5 mM snimljene DCP metodom karakterišu tri talasa (Slika 4. 1): jedan anodni (a_4) i dva katodna ($c_{4'}$ i c_4). Polutaladni potencijal anodnog talasa, $E_{1/2a_4} = -116 \pm 5$ mV je nezavistan od koncentracije V(IV). Iako a_4 talas nije dobro definisan, njegova granična struja, I_{da_4} , direktno je proporcionalna koncentraciji V(IV) jona (Slika 4. 2), sa prosečnom vrednošću konstante difuzione struje anodnog talasa $I_{ka_4} = 1.06 \pm 0.02$.



Slika 4. 1. DCP krive rastućih koncentracija V(IV) u HEPES - u, pH 7.2. Označeni su položaji anodnog talasa (a_4) i dva katodna talasa ($c_{4'}$ i c_4).

S obzirom na nepravilan oblik i nisku vrednost I_d , katodni talas $c_{4'}$ ($E_{1/2c_{4'}} \sim -420$ mV) nije bio predmet detaljne analize. Polutaladni potencijal talasa c_4 vrednosti $E_{1/2c_4} \sim -1062 \pm 18$ mV je nezavisan od koncentracije jona V(IV). I_{dc_4} karakteriše linearna zavisnost od

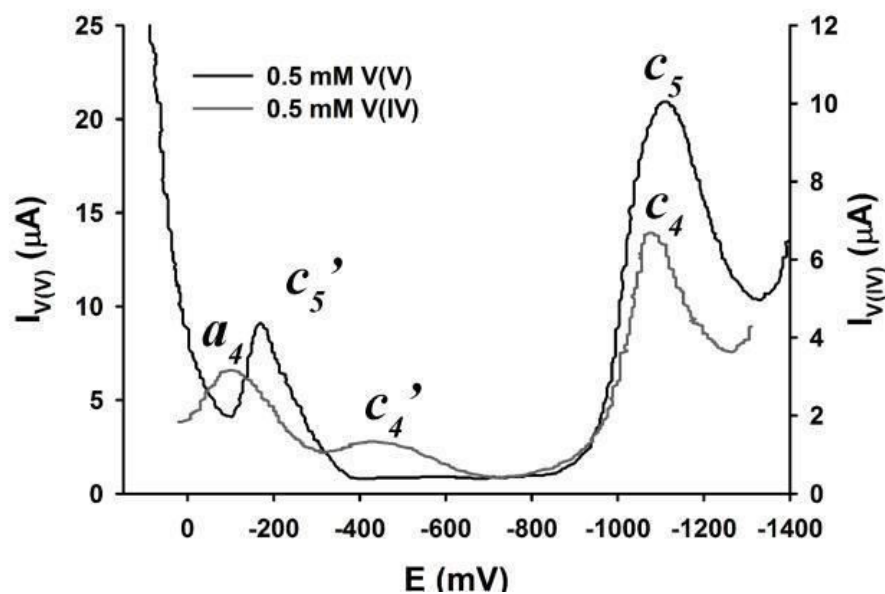
koncentracije V(IV) jona (Slika 4. 2), sa prosečnom vrednošću $I_{kc4} = 1.79 \pm 0.03$. U ovom slučaju, odnos I_{kc4} / I_{ka4} , nasuprot očekivanom, nije ceo broj, već ima vrednost 1.7.



Slika 4. 2. Zavisnost I_d talasa a_4 i c_4 od koncentracije V(IV).

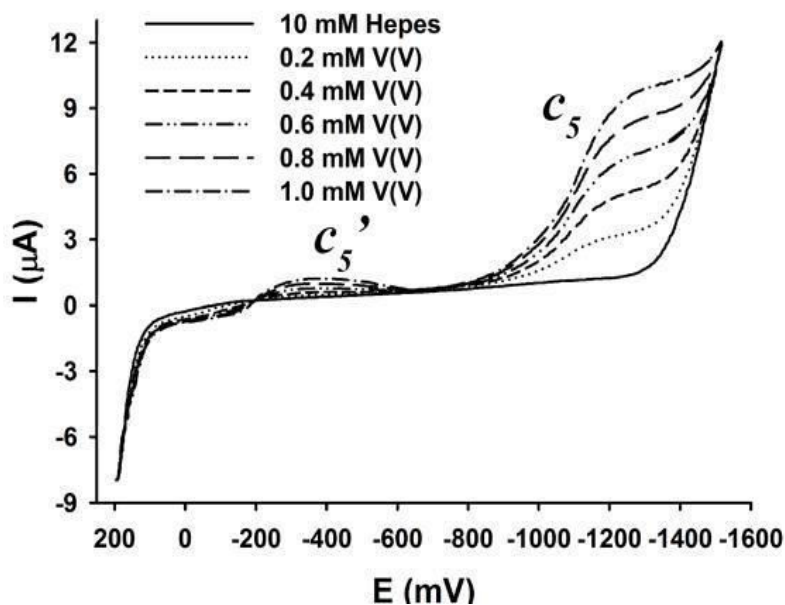
Zbog toga su, u istim eksperimentalnim uslovima, pri koncentraciji V(IV) jona od 0.5 mM izvedeni eksperimenti primenom DP polarografije. Na polarogramima se mogu uočiti tri pika koja odgovaraju trima DCP talasima (a_4 , c_4 i c_4) (Slika 4. 3). Odnos amplituda pikova c_4 i a_4 iznosi 1.99 ± 0.07 .

U slučaju vanadata, V(V), obe primenjene polarografske metode, dale su krive precizno definisanih talasa, odnosno pikova (Slike 4. 3. i 4. 4). Na DCP krivim u opsegu koncentracija V(V) od 0.2 do 2 mM mogu se uočiti dva katodna talasa, c_5 i c_5 , dok DPP krivu pri koncentraciji V(V) od 0.5 mM karakterišu dva analogna pika c_5 i c_5 .



Slika 4. 3. DPP krive V(IV) i V(V) snimljene u puferu. Označeni su položaji tri pika u V(IV) (a_4 , c_4' i c_4) i dva u V(V) (c_5' i c_5).

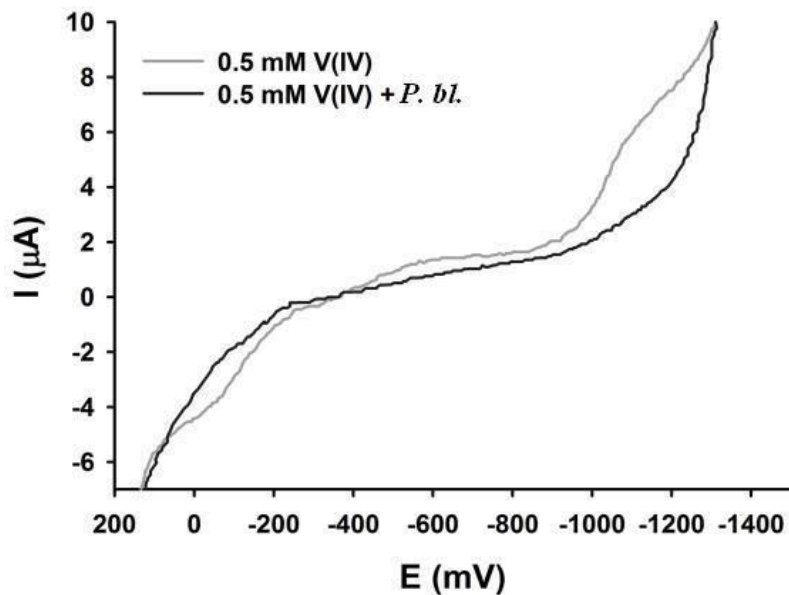
Talas c_5' odlikuje se prisustvom strujnog maksimuma. U prisustvu 1 mM V(V) $E_{1/2c_5'} = (-215 \pm 8)$ mV. Shodno niskoj $I_{dc5'}$ i specifičnom obliku, talas c_5' nije bio pogodan za analizu efekta gljive, te stoga nije detaljnije karakterisan. Polutaladni potencijal talasa c_5 , $E_{1/2c_5} = (-1106 \pm 17)$ mV, nezavisan je od koncentracije V(V), I_{dc5} pokazuje linearnu zavisnost od koncentracije V(V) (Slika 4. 8), sa $I_{kc_5} = 5.32 \pm 0.08$. S obzirom da razlika između polutalasnih potencijala talasa c_5 i c_4 iznosi svega 44 mV, ova dva talasa se gotovo preklapaju (Slika 4. 4). Odnos $I_{kc_5} / I_{kc_4} = 3$.



Slika 4. 4. DCP krive rastućih koncentracija V(V). Označena su dva katodna talasa (c_5' i c_5).

4. 1. 2. Efekat micelijuma *P. blakesleeanus* na polarografske krive V(IV) i V(V)

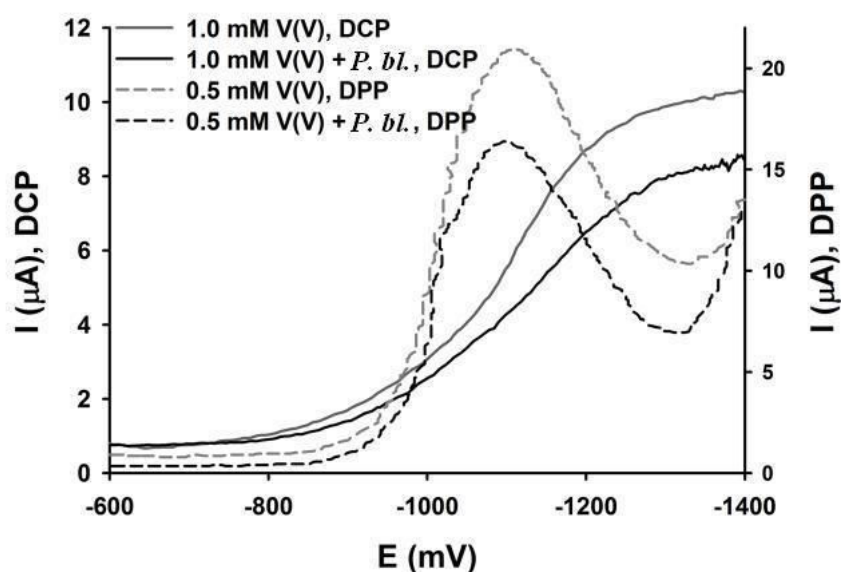
Dodavanje suspenzije micelijuma *P. blakesleeanus* u pufer dovodi do značajnih promena izgleda DCP krivih jona V(IV) (Slika 4. 5) i V(V) (Slika 4. 6).



Slika 4. 5. Uticaj micelijuma *P. blakesleeanus* na polarogram V(IV). Poređenje DCP krivih V(IV) u osnovnom elektrolitu i u prisustvu micelijuma.

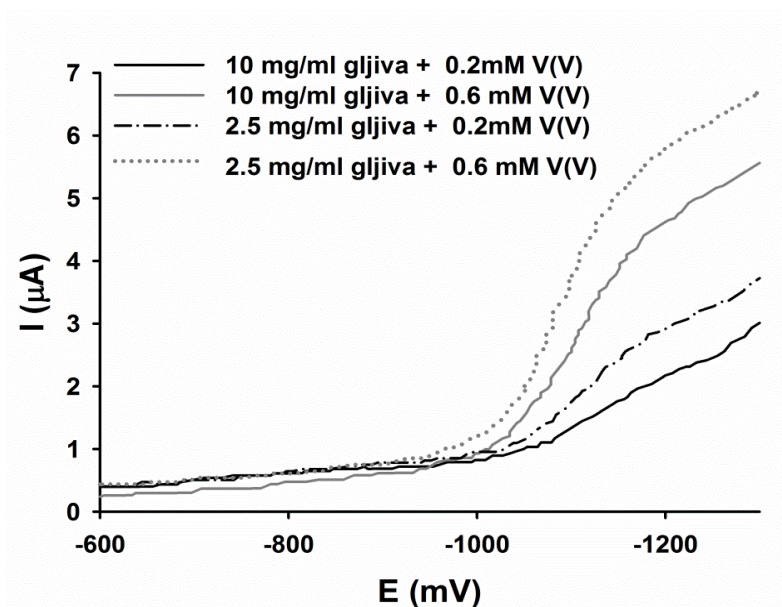
Za analizu uticaja micelijuma odabrani su talasi c_4 i c_5 , kao najbolje definisani. U slučaju V(IV) sva tri talasa nestaju, ukazujući na to da micelijum u potpunosti uklanja ove jone iz pufera (Slika 4. 5).

Što se tiče DCP krive V(V) jona, efekat iste količine micelijuma je manje izražen (Slika 4. 6). Kako DCP tako i DPP krive ukazuju na to da dodavanje micelijuma dovodi do snižavanja I_{dc5} , bez efekata na $E_{1/2c5}$ ili oblik samog talasa / pika, u odnosu na polarograme u puferu.

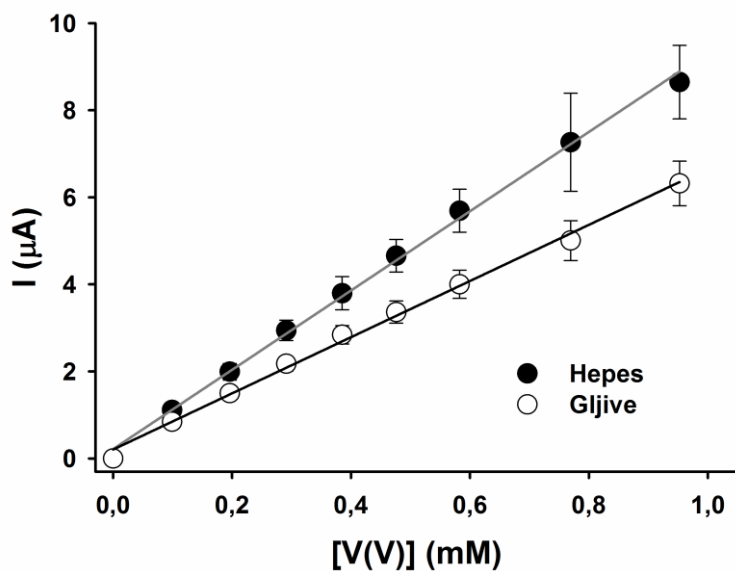


Slika 4. 6. Uticaj micelijuma *P. blakesleeanus* na polarograme V(V). Poređenje DCP i DPP krivih V(V) u puferu i po dodatku micelijuma.

Četvorostruko uvećanje koncentracije micelijuma dovodi do daljeg snižavanja vrednosti I_{dc5} , potvrđujući da je smanjenje posledica aktivnosti micelijuma (Slika 4. 7). I_{dc5} u prisustvu micelijuma pokazuje linearnu zavisnost od koncentracije jona V(V) (Slika 4. 8).

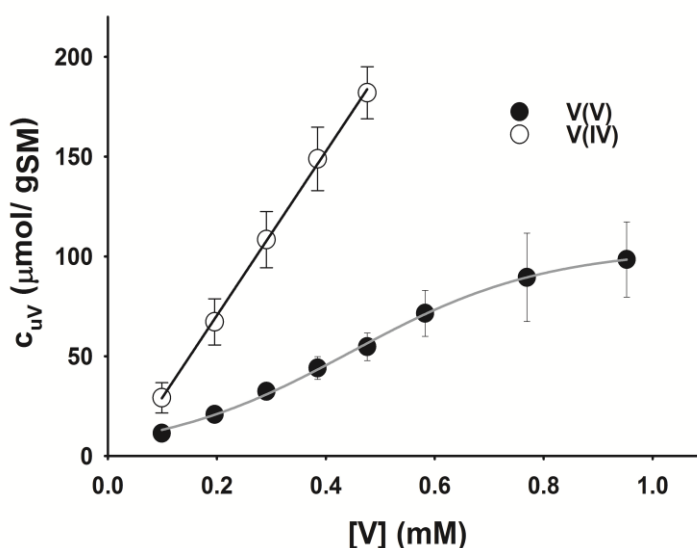


Slika 4. 7. Uticaj četverostrukog povećanja koncentracije micelijuma (sa 2.5 mg_{sm} / ml na 10 mg_{sm} / ml) na DCP krive.



Slika 4. 8. Poređenje zavisnosti I_{dc5} od koncentracije V(V) u puferu i u prisustvu micelijuma.

Sniženje vrednosti I_{dc5} delovanjem micelijuma *P. blakesleeanus* relativno je konstantno i statistički značajno u okviru celokupnog koncentracionog opsega (0.1 – 1 mM) V(V) jona, sa prosečnom vrednošću od približno 27 %. Međutim, deo difuzione struje koji odgovara količini V(V) jona koje je micelijum usvojio karakteriše sigmoidna zavisnost - ukazujući na zasićenje - od koncentracije V(V) (Slika 4. 9). Pri koncentraciji jona V(V) od 1mM, micelijum dostiže 95 % celokupnog usvajanja. Iz parametara utvrđene sigmoidalne zavisnosti procenjeno je da bi maksimalno usvajanje iznosilo $104 \pm 2 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$. Kapacitet micelijuma za usvajanje V(IV) je značajno veći i linearno raste u celom opsegu primenjenih koncentracija (0.1 – 0.5 mM), dostižući vrednost od $185 \pm 12 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$ pri 0.5 mM V(IV) (Slika 4. 9).



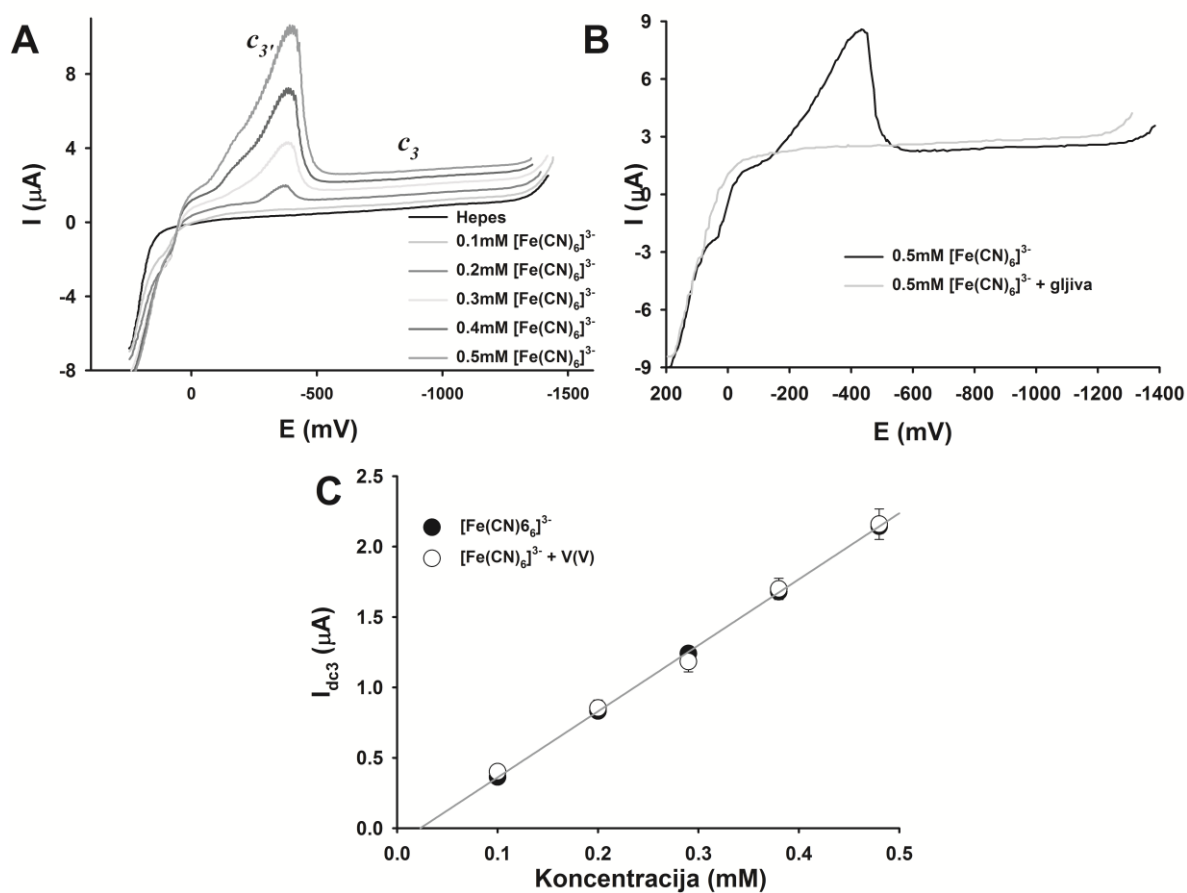
Slika 4. 9. Zavisnost količina V(IV) i V(V), usvojenih od strane micelijuma ($c_{u,v}$), od njihovih koncentracija u puferu. U slučaju V(V) zavisnost je sigmoidna ($R^2 = 0.999$), a u slučaju V(IV) linearna ($R^2 = 0.999$).

4. 1. 3. Efekat fericijanida (heksacijanoferata(III))

Prethodna istraživanja su pokazala da pri visokim koncentracijama V(V) fericijanid (heksacijanoferata(III)) najvećim delom inhibira njegovu redukciju do V(IV) od strane

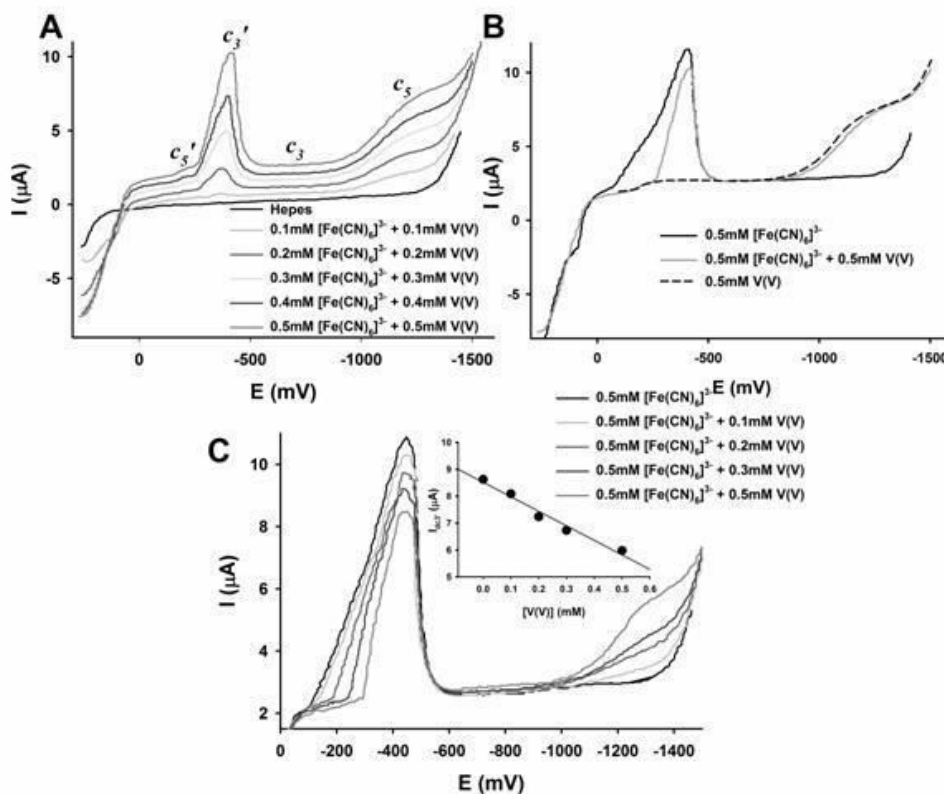
micelijuma *P. blakesleeanus* (Žižić *et al.*, 2013). Ovo je objašnjeno kompeticijom za aktivno mesto enzima sa fericijanid reduktaznom aktivnošću (FeCNR) za koji je pokazano da redukuje fericijanid (Baroja – Mazo *et al.*, 2004), a postoje indicije da je glavno mesto za redukciju V(V) kada se nalazi u visokim koncentracijama (Žižić *et al.*, 2013).

Kako bi ispitali da li fericijanid ispoljava slične efekte i pri niskim koncentracijama dodatog V(V), kada se uglavnom nalazi u obliku monomera, koristili smo DCP metodu (Slika 4. 10).



Slika 4. 10. Polarografska svojstva fericijanida. A. DCP krive rastućih koncentracija fericijanida u puferu. Označena su dva katodna talasa ($c_{3'}$ i c_3). B. Poređenje DCP krivih fericijanida u puferu i po dodatku micelijuma gljive. C. Poređenje zavisnosti I_{dc3} od koncentracije fericijanida i smeše fericijanida i vanadata u puferu.

Najpre smo ispitili polarografsko ponašanje fericijanida u puferu. U skladu sa literaturnim podacima (Kivalo, 1957), polarografska redukcija fericijanida počinje na pozitivnim potencijalima i daje difuzionu struju sa jako dobro definisanim platoom (c_3), na koju je superponiran na, potencijalu pika, $E_p = 423 \pm 13$ mV, širok i izuzetno izražen strujni maksimum (c_3') (Slika 4. 10. A). Strujni maksimum se pojavljuje na koncentraciji fericijanida od 0.2 mM. Na višim koncentracijama fericijanida se jasno može uočiti da talas c_3' ima dve komponente. Uprkos maksimumu vrednosti I_{dc3} su mogle precizno biti određene i pokazale su jasnu linearnu zavisnost od koncentracija fericijanida (Slika 4. 10. C). Dodavanje micelijuma gljive *P. blakesleeanus* je dovelo do potpunog nestanka strujnog maksimuma dok vrednost I_{dc3} raste za 8 ± 2 % ($P = 0.019$, $n = 5$) (Slika 4. 10. B).

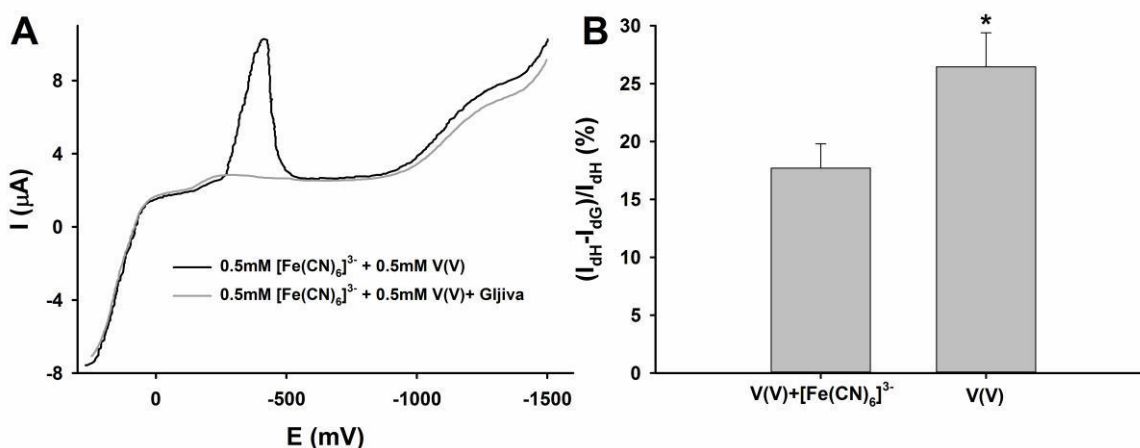


Slika 4. 11. Polarogrami smeše fericijanida i vanadata u puferu. A. DCP krive rastućih koncentracija smeše fericijanida i V(V). Označena su dva katodna talasa poreklom od redukcije vanadata (c_5' i c_5) i dva katodna talasa poreklom od redukcije fericijanida (c_3' i c_3). B. Superponirani polarogrami fericijanida, vanadata i njihove smeše. C. Uticaj porasta koncentracije V(V) pri konstantnoj koncentraciji fericijanida. Umetnuti grafik: Zavisnost $I_{dc3'}$ od koncentracije V(V) pri konstantnoj koncentraciji fericijanida.

Što se tiče polarograma smeše fericijanida i vanadata (Slika 4. 11), karakterišu ga sva četiri katodna talasa, c_5 , c_5' , c_3 i c_3' svojstvena pojedinačnim komponentama (Slika 4. 11. A). Zapravo, ako superponiramo polarograme fericijanida, vanadata i njihove smeše jasno je da polarogram smeše predstavlja prosti zbir polarograma njenih komponenti. Tako ne dolazi do promene vrednosti I_{dc3} , I_{dc5} i $E_{1/2c5} = 1095 \pm 8$ mV (Slika 4. 10. B). Jedini efekat vanadata je redukcija I_{dc3} (Slika 4. 11. C). Sa porastom koncentracije vanadata I_{dc3} linearno opada. Kako mu se pri tome smanjuje i širina, jasno je da je ovo opadanje posledica gubitka jedne od dve komponente ovog talasa. Promene u talasu c_3' nisu od značaja za efekte gljive pošto se on po njenom dodatku potpuno gubi.

Odsustvo promena u difuzionim strujama fericijanida i vanadata ukazuje na odsustvo polarografski merljivih interakcija između ova dva jona u puferu i opravdava korišćenje polarografije za praćenje uticaja fericijanida na interakciju vanadata sa micelijumom gljive (Slika 4. 12).

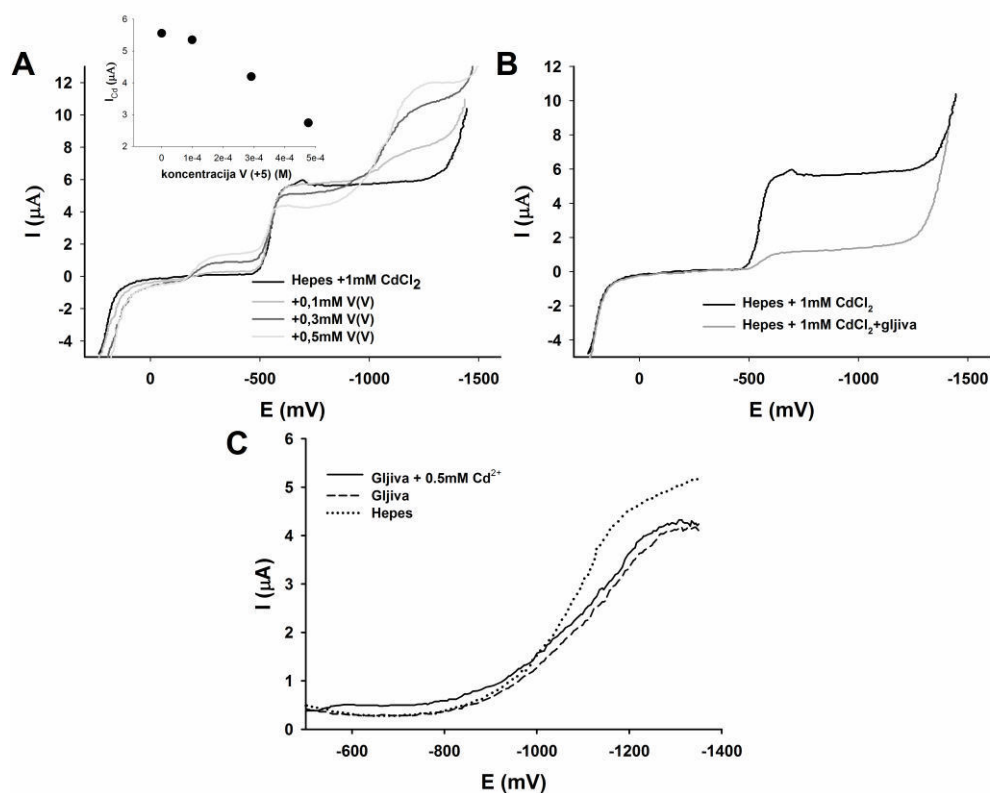
Dodatak micelijuma dovodi do potpunog nestanka talasa c_3' , ali i do smanjenja I_{dc5} (Slika 4. 12. A). Međutim, smanjenje I_{dc5} u prisustvu fericijanida je 18 ± 2 %, dok bez njega iznosi 26 ± 3 % (Slika 4. 12. B). Ova razlika je statistički značajna ($P = 0.041$, $n = 5$) i govori da fericijanid inhibira oko 30 % efekta micelijuma na vandadat.



Slika 4. 12. Uticaj fericijanida na interakciju vanadata sa micelijumom gljive. A. Poređenje DCP krivih smeše V(V) i fericijanida u puferu i po dodatku gljive. B. Smanjenje I_{dc5} u prisustvu fericijanida.

4. 1. 4. Efekat kadmijuma

S obzirom na literaturne podatke prema kojima $250 \mu\text{M Cd}^{2+}$ u potpunosti inhibira FeCNR u membrani *P. blakesleeanus* (Baroja – Mazo et al., 2004), da bi ispitali da li je smanjenje koncentracije V(V) u spoljašnjem rastvoru po dodatku micelijuma posledica redukcije pomoću FeCNR, polarografski su ispitani efekti Cd^{2+} na usvajanje / redukciju V(V) od strane gljive. Polarografska redukcija Cd^{2+} stvara dobro definisan talas na -556 mV (Slika 4. 13. A, B). Dodatak vanadata dovodi do smanjenja ovog talasa (Slika 4. 13. A), tako da 0.5 mM V(V) smanjuje amplitudu Cd^{2+} talasa za 51% . Dodatkom gljive granična struja kadmijumskog talasa se redukuje za $82.2 \pm 0.9 \%$, $n = 3$ (Slika 4. 13. B), što ukazuje da *P. blakesleeanus* ima izraženu sposobnost usvajanja kadmijuma.

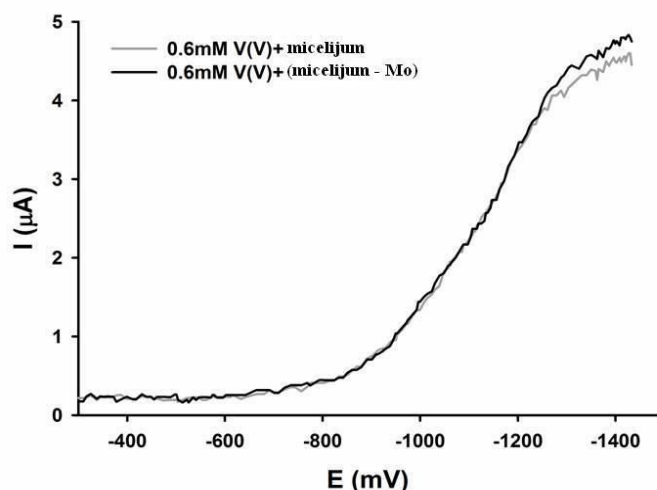


Slika 4. 13. A. DCP kriva Cd^{2+} u puferu i njegove promene usled dodatka V(V). Umetnuti grafik: Zavisnost I_{dCd} od koncentracije V(V) pri konstantnoj koncentraciji CdCl_2 . B. Poređenje DCP krivih Cd^{2+} u puferu i po dodatku micelijuma gljive. C. Poređenje DCP krivih 0.5 mM V(V) u prisustvu micelijuma sa i bez Cd^{2+} sa onim u puferu.

Pretretman 1 mM Cd^{2+} ne utiče na I_{da5} u prisustvu gljive (Slika 4. 13. C), ukazujući da smanjenje koncentracije V(V) u puferu po dodatku micelijuma nije posledica njegove redukcije pomoću FeCNR.

4. 1. 5. Efekat uzgoja gljive na podlozi bez molibdata

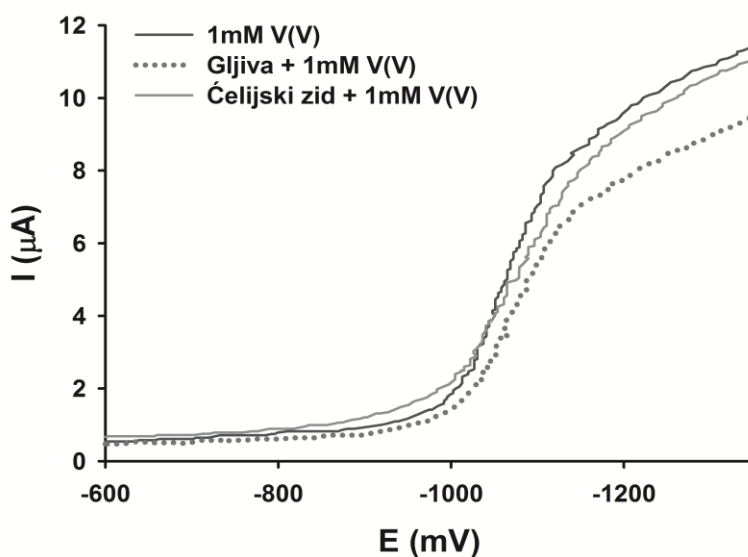
U prethodnim istraživanjima je pokazano da uzgoj micelijuma *P. blakesleeanus* tokom dve generacije na medijumu bez molibdata dovodi do značajnog smanjenja njegove sposobnosti da redukuje V(V) kada je prisutan u visokim koncentracijama i pretežno je u obliku oligomera (Žižić *et al.*, 2013). Ovo je objašnjeno time da je proces redukcije V(V) katalizovan sa FeCNR koji kao kofaktor sadrži Mo – MPT kompleks i nalazi se na površini ćelijske membrane (Žižić *et al.*, 2013). Da bi se ispitalo da li odsustvo molibdata utiče na redukciju V(V) i kada je prisutan u niskim koncentracijama i pretežno je u monomernom obliku izvršeni su DCP eksperimenti sa micelijumom koji je u dve generacije uzgajan na medijumu bez molibdata. DCP krive 0.6 mM V(V) su pokazale da uzgoj micelijuma na podlozi bez molibdata ne dovodi ni do kakvih promena (Slika 4. 14), što baš kao i u slučaju odsustva efekta Cd^{2+} , ukazuje da, za razliku od tetramera, monomer vanadata nije supstrat za FeCNR.



Slika 4. 14. Poređenje DCP krivih V(V) u prisustvu micelijuma gajenog u standardnim uslovima i onog koji je tokom dve generacije gajen na podlozi bez Na_2MoO_4 .

4. 1. 6. Eksperimenti sa izolovanim ćelijskim zidom

Da bi se utvrdila uloga ćelijskog zida u snižavanju vrednosti I_{dc5} , urađeni su DCP eksperimenti u kojima je umesto micelijuma u pufer dodata adekvatna količina izolovanog ćelijskog zida *P. blakesleeanus*. Kao što se vidi sa Slike 4. 15., ćelijski zid dovodi do smanjenja I_{dc5} za samo 3 % u odnosu na pufer, ukazujući na zanemarljiv kapacitet ćelijskog zida za vezivanje, odnosno redukciju V(V).



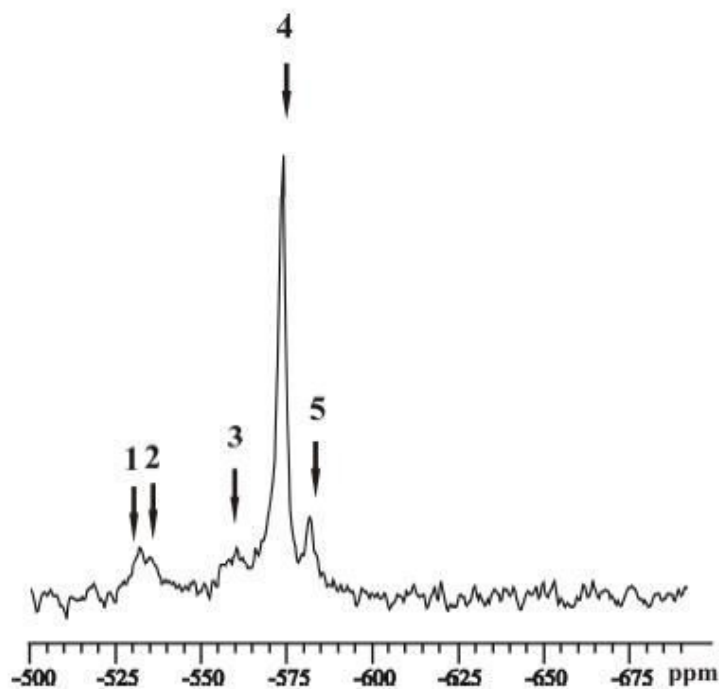
Slika 4. 15. DCP krive V(V) u puferu, nakon dodavanja suspenzije micelijuma i izolovanog ćelijskog zida.

U prilog ovom zaključku ide i rezultat dobijen snimanjem ^{51}V NMR spektra izolovanog ćelijskog zida tretiranog vanadatom, koji će biti prikazan u narednom poglavlju.

4. 2. ^{51}V NMR ispitivanja

Kontrolni ^{51}V spektar je snimljen 5 minuta nakon dodavanja $80 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$ micelijumu *P. blakesleeanus* starom 24 h. Shodno dobro poznatim vrednostima hemijskih pomaka vanadata u NMR spektrima (Rehder, 2008), signali u spektru mogu se pripisati V(V) pentameru (- 583 ppm) (**5**), tetrameru (- 575 ppm, najvišeg intenziteta) (**4**), monomeru ili dimeru (- 561 ppm) (**3**), monomeru (- 535 ppm) (**2**) (Slika 4. 16).

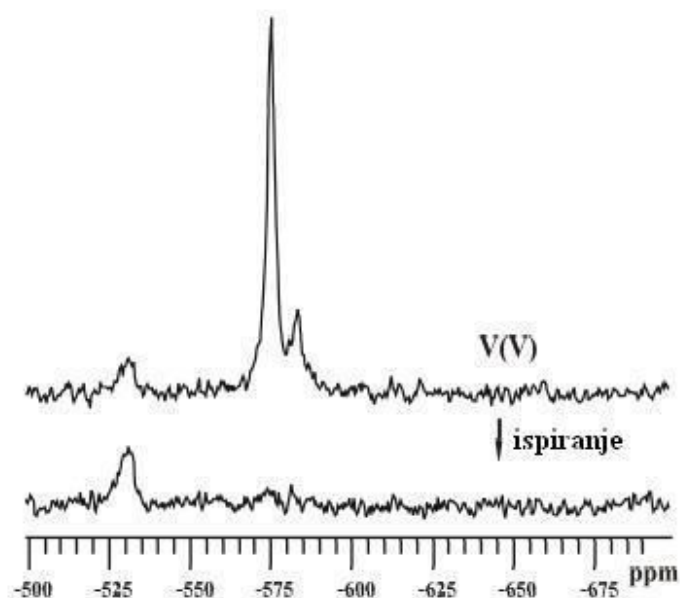
Pad u ukupnoj koncentraciji vanadata (- 510 ppm – do - 610 ppm) nakon tretmana visokom koncentracijom Na_3VO_4 ukazuje na redukciju pojedinih oligomernih vrsta i uzrok je potpunog nestanka signala monomera i dimera, kao i izraženog smanjenja intenziteta signala tetramera 40 min. po dodavanju vanadata. Četiri sata nakon dodavanja vanadata, u micelijumu su detektovani jedino signali na - 532 ppm i - 575 ppm istog intenziteta.



Slika 4. 16. Kontrolni ^{51}V NMR spektar micelijuma *P. blakesleeanus* nakon dodavanja vanadata ($80 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$).

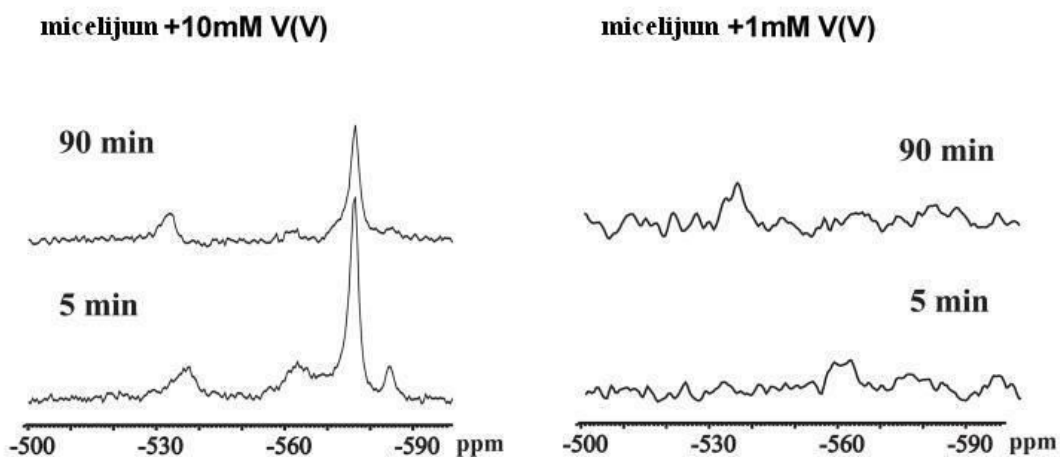
^{51}V NMR metoda je primenjena u cilju rasvetljavanja oblika vanadata dodatog u vidu natrijum ortovanadata apliciranog u različitim koncentracijama.

S obzirom da je metabolička aktivnost vanadata, manifestovana i značajnim porastom odnosa intenziteta signala polifosfata i fosfata u micelijumu *P. blakesleeanus*, dokazana (Žižić *et al.*, 2014), posebno je značajno utvrditi koji oblik vanadata uzrokuje tu promenu i koje vrste oligomera V(V) u ćeliji uopšte postoje. U tu svrhu je snimljen ^{51}V NMR spektar micelijuma ispranog 35 min. nakon tretmana vanadatom (Slika 4. 17). Po ispiranju, pik na – 532 ppm još uvek je uočljiv, sa gotovo nesmanjenim intenzitetom u odnosu na neispran micelijum. Uočljiva je i grupa signala na oko – 575 ppm, znatno smanjenog intenziteta.



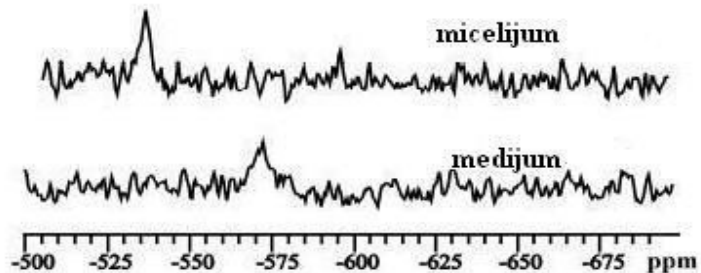
Slika 4. 17. Spektar ^{51}V NMR micelijuma *P. blakesleeanus* 35 min. po dodavanju vanadata i ispranog micelijuma nakon tretmana, kontrola; koncentracija vanadata 20 mM.

^{51}V NMR spektar micelijuma tretiranog vanadatom u koncentraciji od $3.5 \mu\text{M} / \text{g}_{\text{sm}} \text{V(V)}$ (približno 1 mM) predstavljen je na Slici 4. 18. Neposredno po dodavanju uočen je samo signal monomera, na -559 ppm . Razlika u poziciji signala monomera pri različitim koncentracijama V(V) jona je posledica razlike u vrednosti pH i koncentracije. Gotovo nepromenjena koncentracija V(V) detektovana je u spektru snimljenom 90 minuta, dok je 90 minuta nakon tretmana micelijuma višom koncentracijom, $35 \mu\text{M} / \text{g}_{\text{sm}} \text{V(V)}$, uočeno smanjenje ukupnog intenziteta spektra (u opsegu ppm) za približno 30 % (Slika 4. 18). Ovi rezultati idu u prilog činjenici da micelijum *P. blakesleeanus* nema kapacitet za redukciju monomera vanadata. Iako ne dolazi do redukcije vanadata, sa spektra je evidentno da dolazi do transformacije prvobitnog oblika što se ogleda u pojavi signala na -532 ppm .



Slika 4. 18. ^{51}V NMR spektar micelijuma *P. blakesleeanus* tokom inkubacije sa 10 mM V(V) , levo i 1 mM V(V) , desno.

U spektru micelijuma gajenog u medijumu koji je sadržao 5 i 7 mM vanadat, što su koncentracije koje omogućavaju veći prinos (Žižić *et al.*, 2013), takođe je detektovan i signal na -532 ppm (Slika 4. 19).



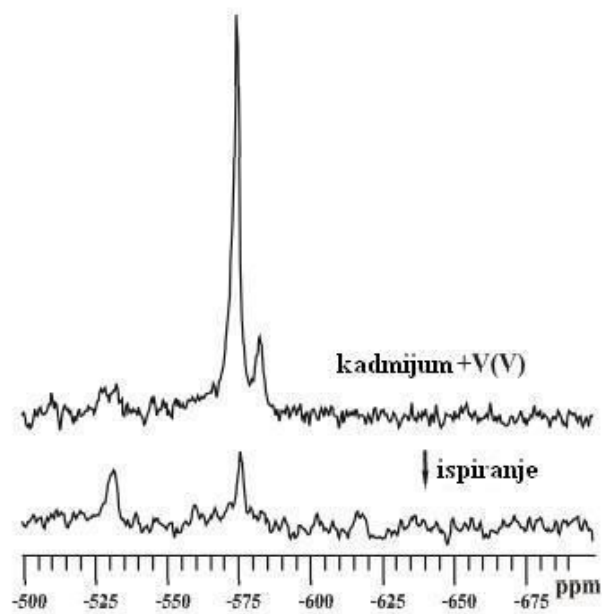
Slika. 4. 19. ^{51}V NMR spektri micelijuma i hranljivog medijuma, dobijenog filtracijom micelijuma kultivisanog u medijumu koji je sadržao 5 mM vanadat.

U filtratu hranljivog medijuma dobijenom iz micelijuma starog 24 h koji je gajen na vanadatu u dve pomenute koncentracije, jedini detektovani signal je signal koji, prema odgovarajućim pH vrednostima (oko 7.5), odgovara dimeru, na -571 ppm (Slika 4. 19).

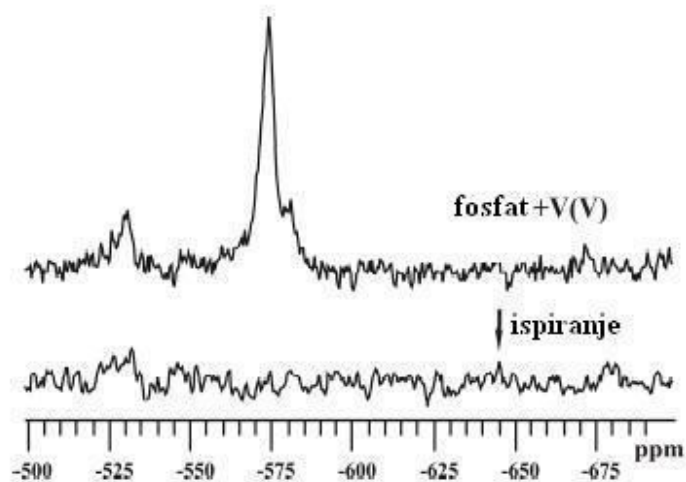
U prethodnim istraživanjima je utvrđeno da se veliki deo prvobitno dodatog vanadata redukuje i da je za takav proces u najvećoj meri odgovoran enzim sa fericijanid reduktaznom aktivnošću (Žižić *et al.*, 2014). Ipak, u prisustvu vanadata u koncentracijama u kojima je prisutan samo monomerni oblik ovog jedinjenja (< 1 mM), redukcije skoro da nema. Stoga je bilo neophodno utvrditi specifičnost ovog enzima i identifikovati oblik V(V) koji se redukuje, kao i ispitati da li se vanadat transportuje u ćeliju putem fosfatnih transportera. Stoga smo pre dodatka vanadata micelijum tretirali sa CdCl_2 i neorganskim fosfatima.

Poznato je da kadmijum inhibira enzim sa fericijanid reduktaznom aktivnošću (FeCNR) (Baroja – Mazo *et al.*, 2004), za koji se pretpostavlja da je odgovoran za redukciju V(V), dok se pretpostavlja da vanadat ulazi u ćeliju fosfatnim transporterima i da se fosfati prioritetno vezuju za ove proteine (Žižić *et al.*, 2013; Bowman, 1983). Spektri, (Slike 4. 20. i 4. 21) su snimljeni odmah (I_0) i 35 min. nakon tretmana vanadatom (I_{35}). Odnos intenziteta signalā (računatih kao površinā koje oni određuju) ovih spektara (I_{35} / I_0)

ukazivao je na razlike u stepenu redukcije V(V) procenjene kao smanjenje intenziteta signala u uzorcima tretiranim kadmijumom i neorganskim fosfatom.

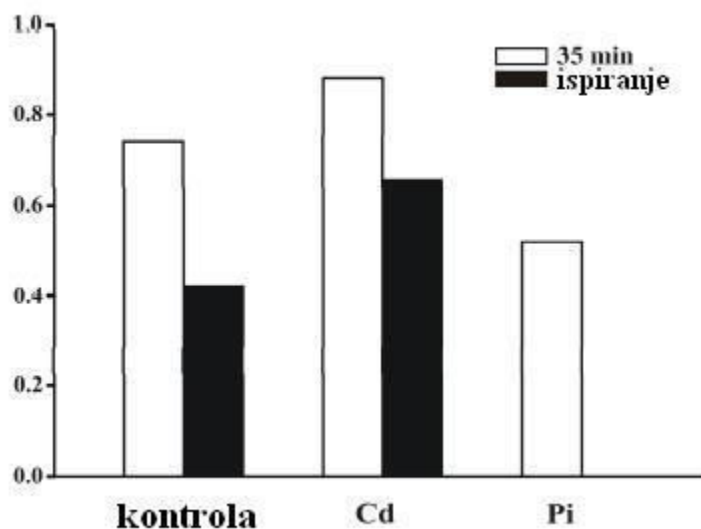


Slika 4. 20. Micelijum tretiran sa CdCl₂ (20 μmol / g_{sm}).



Slika 4. 21. Micelijum tretiran sa Pi (36.7 mM).

Naime, redukcija $V(V)$ bila je sporija u micelijumu tretiranom kadmijumom u odnosu na kontrolu ($I_{35} / I_0 = 0.88$ i 0.74 , respektivno), dok je u micelijumu tretiranom fosfatom, bila brža ($I_{35} / I_0 = 0.52$) (Slika 4. 22). Takođe, analizom spektara uzoraka tretiranih kadmijumom i fosfatima, uočene su razlike u intenzitetima nekih pojedinačnih signala u spektrima I_{35} u odnosu na spektre I_0 . U micelijumu tretiranom kadmijumom, intenziteti signala na -535 , -561 i -575 ppm su smanjeni, dok je signal -532 ppm porastao. U micelijumu tretiranom neorganskim fosfatom, smanjenje u integrisanoj oblasti uglavnom se pripisuje smanjenju intenziteta signala na -575 ppm, sa manjim doprinosom signala na -583 ppm.

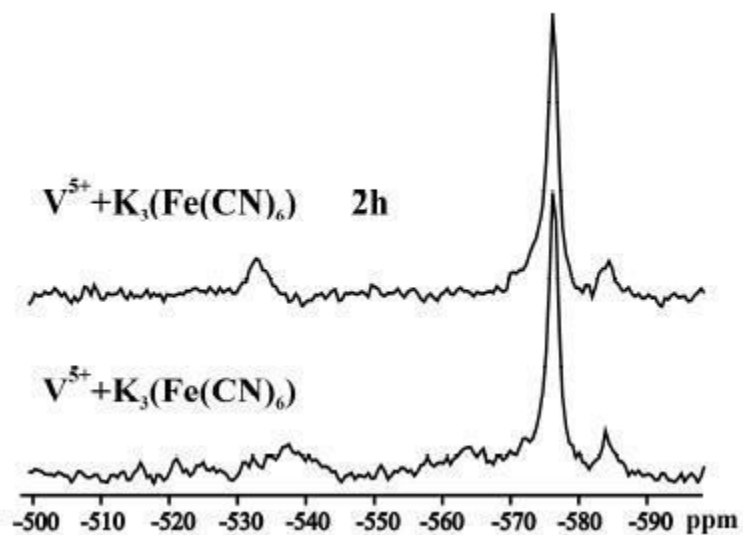


Slika 4. 22. Integrisana oblast (-510 do -610 ppm). U svim slučajevima, beli stubići (označeni kao „35 min.“) predstavljaju odnos intenzitetā (I_{35} / I_0) spektra snimljenog 35 min. nakon tretmana i početnog spektra; crni stubići (označeni kao „ispiranje“) predstavljaju odnos intenzitetā ($I_{ispr.} / I_0$) ispranog micelijuma 35 min. nakon tretmana i inicijalnog (kontrolnog) spektra. S obzirom da je intenzitet donjeg spektra na Slici 4. 21. skoro jednak nuli, ne postoji ($I_{ispr.} / I_0$) stubić za tretman fosfatom na Slici 4. 22.

Nasuprot kontroli (ispran micelijum 35 minuta nakon što je tretiran 20 mM vanadatom), gde je preovlađivao signal na -532 ppm, u micelijumu tretiranom kadmijumom, jasno su uočena dva signala gotovo jednakog intenziteta, na -532 ppm i -575 ppm (Slika 4. 20), što govori u prilog činjenici da je tetramer taj oblik vanadata koji je susprtat za FeCNR.

Rezultati predstavljeni na Slici 4. 22. potvrđuju prisustvo intracelularnih vrsta vanadata u kontrolnom i micelijumu tretiranom kadmijumom ($I_{\text{ispr.}} / I_0 = 0.42$ i 0.66 , respektivno). Ovo ukazuje na to da je u kadmijumom tretiranim uzorcima određena količina vanadata ušla u ćeliju (kao i u kontrolnim uzorcima), ali nije bila redukovana dejstvom FeCNR. U spektrima snimljenim nakon tretmana inorganskim fosfatom, svi signali su nakon ispiranja nestali (Slika 4. 21), što ukazuje na prisustvo uglavnom ekstracelularnog vanadata.

U cilju identifikacije V(V) vrsta koje se mogu vezati za FeCNR enzim, osim eksperimenata u kojima je inhibirana redukciona sposobnost enzima dodavanjem kadmijuma, praćene su promene u koncentracijama vanadata u prisustvu kalijum fericijanida. Micelijum je pre tretmana 30 min. inkubiran sa $K_3[Fe(CN)_6]$, kompetitorom za enzimatsku redukciju posredstvom FeCNR (*Baroja – Mazo et al., 2004*). Rezultati su predstavljeni na Slici 4. 23. Intenzitet signala tetramera vanadata (V4) u micelijumu preinkubiranom fericijanidom ostao je nepromenjen tokom 2 sata po dodavanju vanadata, dok je u vanadatom tretiranom micelijumu on značajno, za 56 %, opao (Slika 4. 18).



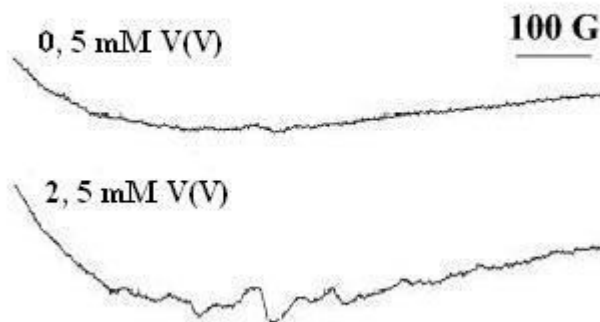
Slika 4. 23. ^{51}V NMR spektri micelijuma, preinkubiranog $K_3[Fe(CN)_6]$ 30 min., snimljeni neposredno i 2 h nakon dodavanja vanadata.

Ovo ukazuje na viši afinitet enzima sa fericijanidnom aktivnošću (FeCNR) za vezivanje / redukciju $K_3[Fe(CN)_6]$ u odnosu na V(V).

4. 3. EPR eksperimenti

U cilju rasvetljavanja mehanizma uticaja micelijuma *P. blakesleeanus* na visinu difuzione struje katodnog pika c_5 i talasa c_5 vanadata (Slike 4. 3. i 4. 4), dobijenih polarografskim tehnikama, korišćena je i metoda EPR spektroskopije.

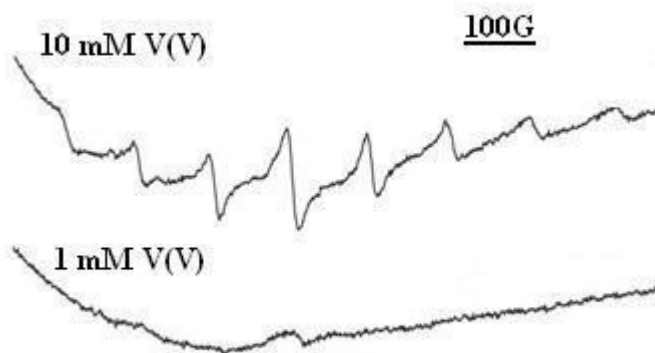
Snimljeni su spektri micelijuma nakon što mu je dodavan V(V) u četiri različite koncentracije. Najpre su snimljeni spektri micelijuma tretiranog sa 0.5 i 2.5 mM vanadatom (Slika 4. 24). Pod kontrolisanim uslovima pH, nakon dodavanja 0.5 mM V(V) zabeležena je skoro zanemarljiva redukcija vanadata, što potvrđuje da se proces redukcije u micelijumu *P. blakesleeanus* ne odnosi na redukciju monomera, V1, već verovatno na enzimatsku redukciju tetramera V4.



Slika 4. 24. EPR spektar V(IV) u micelijumu inkubiranom 35 min sa V(V).

Zatim su snimljeni i spektri micelijuma pri višim koncentracijama vanadata. Dodavanje 3.5 μM / g_{sm} V(V) (približno 1 mM) micelijumu dovelo je u EPR spektru do pojave zanemarljivog signala V(IV), 5 minuta nakon dodavanja (Slika 4. 25, *donji zapis*), dok je

tretman 10 puta višom koncentracijom V(V), nakon istog vremena, proizveo V(IV) spektar sa osam karakterističnih linija (Slika 4. 25, *gornji zapis*).

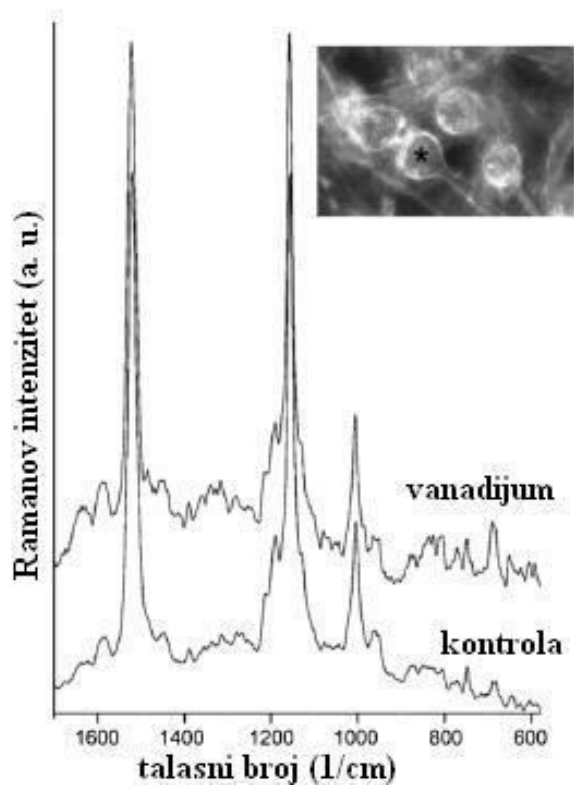


Slika 4. 25. EPR spektar V(IV) u micelijumu inkubiranom sa V(V) u trajanju od 5 minuta.

Ovo ukazuje na odsustvo redukcije V(V) do V(IV) pri koncentraciji od 1 mM i nižim i može se dovesti u vezu sa nedostatkom V(V) vrsta (jona) dostupnih za redukciju od strane micelijuma.

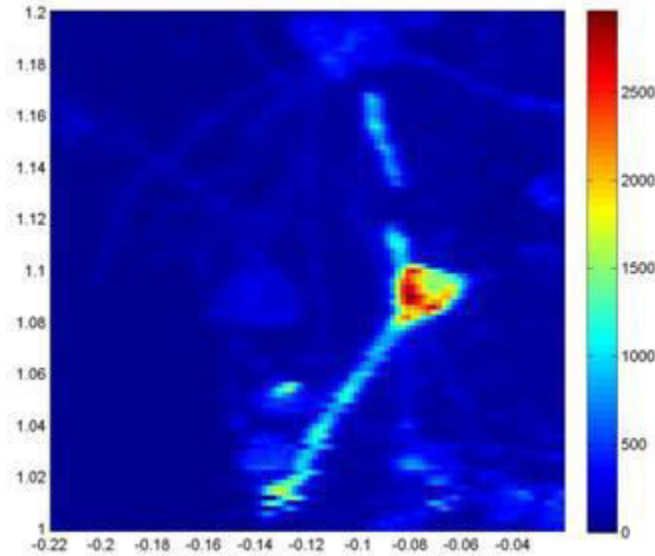
4. 4. Ramanska mikrospektroskopija

Ova metoda korišćena je u cilju dobijanja informacije o potencijalnom vezivanju vanadijuma za molekule unutar ćelija micelijuma *P. blakesleeanus* (Slika 4. 26). Primenom mikro – XRF metode (*eng., micro X – ray fluorescence imaging*) je utvrđeno da je, nakon tretmana, najviša koncentracija vanadijuma u bazalnom delu hifa. Ramanski spektri snimljeni su u toj oblasti (Slika 4. 26, *insert*), pri čemu je kombinacijom primene elektronske i XRF mikroskopske, ovaj deo ćelije identifikovan kao vakuola (Slika 4. 27) (*Žižić et al., 2015*).



Slika 4. 26. Efekti vanadata na ramanski spektar 24 h starog micelijuma *P. blakesleeanus*. Reprezentativni ramanski spektri kontrolnog i vanadatom tretiranog micelijuma; *insert* predstavlja mikrografiju hife *P. blakesleeanus*; mesto snimanja spektra obeleženo je zvezdicom.

Izbor mesta akvizicije ramanskog spektra predstavljen je na Slici 4. 27. Svaki ćelijski odeljak može predstavljati sistem za sebe, tako da je skeniranje uzorka XRF mikroskopskom spektroskopijom primenom X – zraka energija bliskih energiji apsorpcionog prelaza unutrašnjih elektrona vanadijuma neophodno za identifikaciju mestā akumulacije ispitivanog atoma. Na ovaj način se određuje prostorni raspored određenog atoma u uzorku ili ćeliji, bez zalaženja u strukturne karakteristike (valencu, simetriju i sl.)

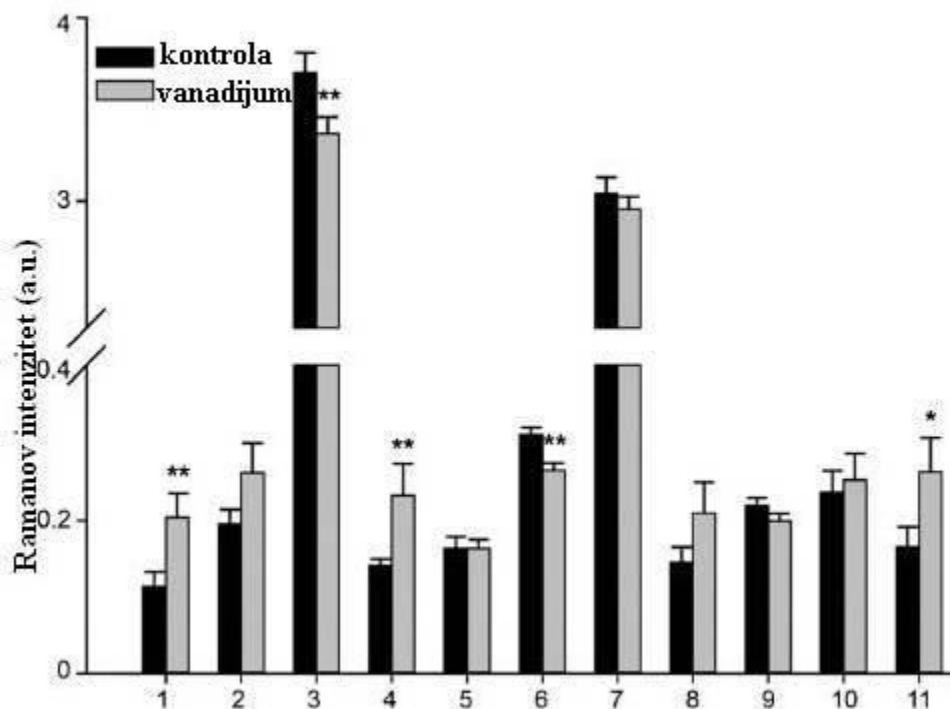


Slika 4. 27. Pozicioniranje vanadata u micelijumu *P. blakesleeanus* tretiranog sa V(V), primenom tehnike XRF.

Identifikacija traka u ramanskom spektru micelijuma *P. blakesleeanus* izvršena je uzevši u obzir ranije podatke za biološka tkiva (Movasaghi et al., 2007; De Gussem et al., 2005; Sujith et al., 2009). Najizraženije trake su na 1523 cm^{-1} i 1635 cm^{-1} , koje odgovaraju istežućim vibracijama hitozana i / ili hitina u ćelijskom zidu, respektivno (Zhang et al., 2012). Ramanove trake karakteristične za polifosfate u vakuolama kvasca nalaze se približno na 688 cm^{-1} i 1156 cm^{-1} (Bednarova et al., 2012). Obe su prisutne u spektru hifalnog regiona *P. blakesleeanus* odabranog za merenje (traka na 1154 cm^{-1} je visokog intenziteta).

Traka na 1005 cm^{-1} , karakteristična za vibracije C – C veza u prstenu (Movasaghi et al., 2007) upotrebljena je za internu standardizaciju intenziteta za kvantifikaciju promena intenzitetā traka uočenih nakon dodavanja vanadata, s obzirom da je njen intenzitet skoro konstantan u svim snimljenim spektrima. Iz Slike 4. 28. uočljivo je da dodavanje vanadata dovodi do pojačanja intenziteta traka na 1635 , 1589 , 1448 , 1154 i 688 cm^{-1} i smanjenja

intenziteta traka na 1523 i 1190 cm^{-1} . Štaviše, neke od ovih traka pretrpele su promene svojih Ramanovih pomeraja.



Slika 4. 28. Promene intenziteta Ramanovih traka nakon tretmana vanadatom; zvezdice označavaju statističku značajnost (** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; $n = 12$).

U vodenom rastvoru vanadata, trake VO_3^- vrsta javljaju se u regionu od 760 do 1050 cm^{-1} (830, 930 i 945 cm^{-1}) (Ribeiro *et al.*, 2004). Ramanova traka karakteristična za V = O vezu u vanadatu ustanovljena je na 1033 cm^{-1} (čvrsti uzorci), i njen intenzitet je snižen nakon redukcije vanadata (Bronkema and Bell, 2008). U našem eksperimentu, nakon tretmana vanadatom, nisu registrovane V trake koje bi odgovarale V = O vezama u micelijumu, verovatno zbog niske koncentracije dodatog vanadata (Amado *et al.*, 1993), kao i zbog njegove redukcije (Žižić *et al.*, 2013).

4. 5. Biohemijska analiza izolovane ćelijske membrane

U cilju ispitivanja moguće uloge enzima vezanih za ćelijske membrane u redukciji / usvajanju određenog oblika vanadata izolovane su i prečišćavane ćelijske membrane iz micelijuma. Korišćene su dve metode koje se standardno primenjuju – izolacija na dvofaznom sistemu (koja se najčešće primenjuje za izolaciju biljnih ćelijskih membrana) i prečišćavanje na saharoznom gradijentu (kao standardna metoda prečišćavanja ćelijskih membrana iz animalnih i ćelija mikroorganizama). Osnovni problem koji se javljao u obe metode bio je izuzetno mali prinos membrana. Naime, iz 10 - 20 g micelijuma nakon prečišćavanja je dobijano 100 - 500 µg proteina ćelijske membrane, što nije dovoljno za detaljnu analizu čistoće frakcije i aktivnosti FeCNR.

Čistoća dobijenih frakcija analizirana je merenjem aktivnosti marker enzima.

Tabela 4. 1. Aktivnosti marker enzima u različitim frakcijama izolovanim iz micelijuma *P. blakesleanus*. Citohrom c oksidaza je korišćena kao marker za mitohondrije, NADPH-citohrom c reduktaza za endoplazmatični retikulum a hidropsipiruvat reduktaza za peroksizome. PM - plazma membranska frakcija prečišćena na dvofaznom sistemu (U3); mikrozomi – odgovarajuća mikrozomalna frakcija osiromašena plazma membranom (L3); 15/30, 30/40, 40/50 – granični slojevi između slojeva odgovarajućih koncentracija saharoze nakon centrifugiranja uzorka na saharoznom gradijentu.

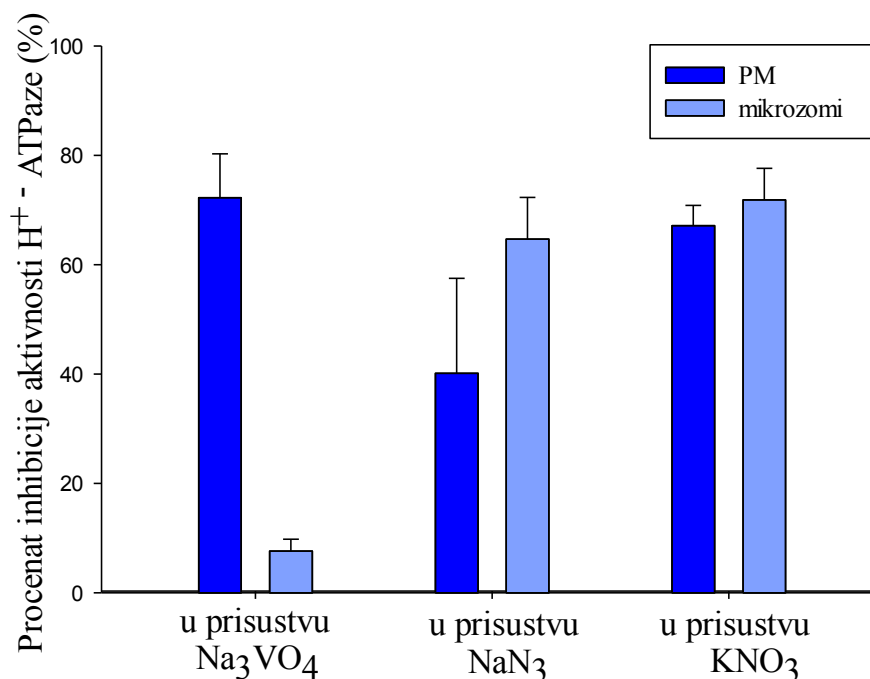
	Prečišćavanje na dvofaznom sistemu		Prečišćavanje na saharoznom gradijentu		
	PM	mikrozomi	15/30	30/40	40/50
Citohrom c oksidaza	0.191±0.0	0.944±0.231	0.132±0.0	0.398±0.037	0.136±0.0
NADPH-citohrom c reduktaza	0.034±0.001	0.159±0.067	0.011±0.006	0.034±0.007	0.052±0.007
Hidropsipiruvat reduktaza	0.022±0.004	0.009±0.006	0.004±0.003	0.004±0.003	0.005±0.002

Aktivnost citohrom c oksidaze je u frakciji prečišćenih ćelijskih membrana sa dvofaznog sistema niska (predstavlja 20 % aktivnosti ovog enzima u mikrozomalnoj frakciji), što ukazuje na relativno nisku kontaminaciju ćelijskih membrana membranom mitohondrija. Sve ispitivane frakcije sa saharoznog gradijenta pokazivale su relativno niske aktivnosti citohrom c oksidaze, ali su ove vrednosti bile varijabilnije nego u uzorcima sa dvofaznog

sistema. NADPH zavisna citohrom c reduktaza koristi se kao marker za endoplazmatični retikulum. U ćelijskim membranama prečišćenim na dvofaznom sistemu, aktivnost ovog enzima je, slično citohrom c oksidazi, smanjena na približno 20 % od aktivnosti koja se nalazi u mikrozomima. Iako se za ovakve membrane ne može reći da predstavljaju potpuno prečišćen izolat ćelijske membrane, dobijeni nivo kontaminacije dozvoljava zaključak da prečišćavanje na dvofaznom sistemu daje frakciju obogaćenu plazma membranom.

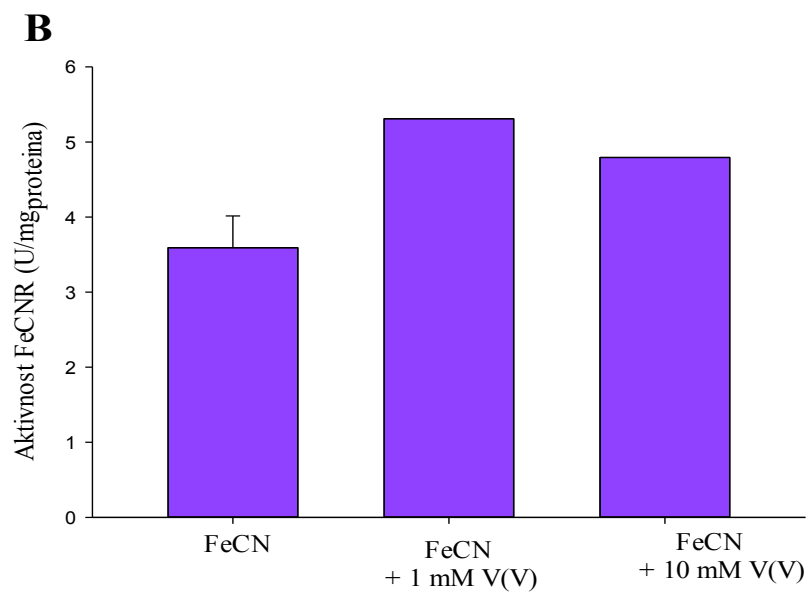
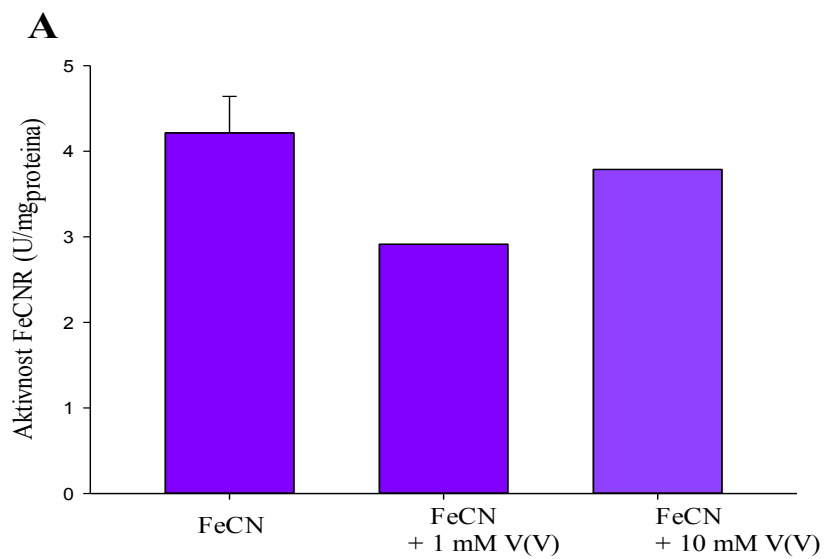
To je potvrđeno i analizom inhibicije ATPaza, kojom je ustanovljeno da je u izolatu ćelijskih membrana od ukupne aktivnosti ATPaza 65 – 85 % bilo osetljivo na natrijum ortovanadat. ATPaza osetljiva na azid koristi se kao marker za mitohondrijalne membrane, i njena aktivnost ukazuje na prisustvo manjih količina mitohondrijalnih membrana u izolatu. Kontaminacija tonoplastom, za koji je kao marker enzim korišćena nitrat – senzitivna ATPaza, je nešto veća (Slika 4. 29). Prema Marriott – u, 1975, ćelijska membrana *Candida albicans* se izdvaja na granici između slojeva 40 % i 50 % saharoze nakon ultracentrifugiranja na diskontinualnom saharoznom gradijentu. Međutim, u slučaju micelijuma *P. blakesleeanus* nijedna od analiziranih frakcija nije pokazala konzistentno obogaćenje bilo kojim od ispitivanih marker enzima. Kako ni u jednoj frakciji nije pronađeno značajno obogaćivanje vanadat - senzitivnom ATPazom, za dalje eksperimente su korišćeni izolati ćelijske membrane prečišćeni na dvofaznom sistemu.

Ustanovljeno je i da su čistoća i prinos membrana dobijenih nakon prečišćavanja na dvofaznom sistemu veći kada se tkivo homogenizuje tučkom u avanu na ledu, nego kada se za homogenizaciju koristi *Polytron*. Verovatno tokom homogenizacije *Polytron* - om, usled turbulencije dolazi do formiranja mešovitih i višeslojnih vezikula čak i pri kratkom vremenu homogenizacije (2 x 3 s). Zato je za izolaciju ćelijskih membrana na kojima je ispitivana FeCNR aktivnost homogenizacija rađena tučkom, u avanu.



Slika 4. 29. ATPaze kao marker enzimi za različite ćelijske frakcije. Na grafiku je uočljivo višestruko obogaćenje plazma membranske frakcije vanadat - senzitivnom ATPazom, dok je zastupljenost nitrat - i azid - senzitivnih ATPaza veća u mikrozomalnoj frakciji.

Pod pretpostavkom da je enzim koji može da katalizuje redukciju vanadata fericijanid reduktaza, (Žižić *et al.* 2013) praćen je uticaj prisustva vanadata na fericijanid reduktaznu aktivnost. Međutim, različite koncentracije vanadata nisu imale značajnog uticaja na redukciju fericijanida od strane plazma membrane. Fericijanid reduktaza ima veći afinitet za vezivanje fericijanida nego vanadata, pa je moguće da prisustvo niskih koncentracija vanadata ne utiče na redukciju fericijanida. U svakom slučaju, nije bilo statistički značajnih efekata kada se uzme srednja vrednost iz više izolacija (Slika 4. 30., A i B).



Slika 4. 30. Aktivnost fericijanid reduktaze i uticaj vanadata na redukciju fericijanida od strane plazma membrane. A. izolacija 1. B. izolacija 2.

Iako bez statističke značajnosti, u nekim izolatima se javljala inhibicija a u drugim blaga stimulacija redukcije fericijanida 1 mM vanadatom. Izostanak efekta 10 mM vanadata se možda može objasniti polimerizacijom vanadata, koji tako polimerizovan ne interaguje sa enzimom.

Rezultati koji se odnose na aktivnost membranskog enzima sa FeCN reduktaznom aktivnošću, imajući u vidu primenjene koncentracije vanadata, teško se mogu pripisati činjenici da monomer nije supstrat, već pre višem afinitetu za FeCN u odnosu na vanadat.

5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji bavili smo se usvajanjem i hemijom vanadijuma u oksidacionom stanju +5 u micelijumu gljive *P. blakesleeanus*. Vanadijum za većinu organizama predstavlja esencijalni mikroelement iako njegova biološka funkcija još uvek nije sasvim razjašnjena (Rehder 2008). Još krajem XIX veka vanadijum u obliku vanadata se koristio u tretmanu različitih vrsta bolesti (anemije, tuberkuloze, hroničnog reumatizma), a pre svega dijabetesa zbog čega mu je pripisana insulin - mimetička aktivnost (Tsiani i Fantus, 1997). Brojna istraživanja poslednjih dekada su potvrdila ovakve pretpostavke (Tolman et al., 1979; Rodríguez - Gil et al., 1991), ali je relativno visoka toksičnost ovog oblika ostala glavni problem u njegovoj primeni u medicini. Redukcija vanadata kao i stvaranje kompleksa sa organskim jedinjenjima su osnovni mehanizmi kojima se minimizuju njegovi štetni efekti (Rehder 2008). U našim prethodnim istraživanjima na gljivi *P. blakesleeanus* toksični efekat vanadata dodatog u milimolarnim koncentracijama je zanemarljiv, njegova metabolička aktivnost je izražena (Žižić et al., 2014), dok se znatan procenat redukuje (Žižić et al., 2013). S obzirom da se u milimolarnim koncentracijama vanadat nalazi kao mešavina više oligomernih oblika bilo je bitno utvrditi koji oblik zapravo ulazi u ćeliju, koji se redukuje, i da li se unutarćelijski vanadat redukuje ili ostaje u svom inicijalnom oksidacionom stanju.

U ovom istraživanju, primenom ^{51}V NMR smo pokazali da je pri visokim koncentracijama ($80 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$), u kojima se vanadat pokazao kao efikasan u pogledu uticaja na fosfatni metabolizam ove gljive, tetramer osnovna V(V) vrsta koja podleže redukciji (Slika 4. 16). Ovaj proces se inhibira u velikoj meri u prisustvu fericianida (Slika 4. 23) i Cd^{2+} (Slika 4. 20), čime su potvrđeni EPR rezultati koji su ukazivali da je FeCNR osnovni enzim uključen u proces redukcije i pokazano da mu je tetramer V(V) osnovni supstrat. Sa druge strane, utvrđeno je da gljiva usvaja vanadat u njegovom izvornom oksidacionom obliku, on gradi kompleks sa nekim unutarćelijskim organskim jedinjenjem, što je verovatno i uzrok rezistentnosti gljive na visoku koncentraciju V(V).

Raznolikost interakcija V(V) sa micelijumom *P. blakesleeanus* pri relativno visokim koncentracijama (> 2 mM), za koje je pokazano da favorizuju formiranje dimera, tetramera i pentamera (Slika 4. 16), je posledica pojave ovih oligomernih vrsta u spoljašnjem rastvoru tj. različite vrste odgovora gljive na različitu oligomernu vrstu.

Primena ovako visokih koncentracija je bila uslovljena, s jedne strane granicom osetljivosti NMR metode i specifičnim eksperimentalnim uslovima u EPR merenjima koja su zahtevala značajnu biomasu minimalno vlažnog uzorka micelijuma, pa time i delovanje sa što koncentrovanijim rastvorom V(V), a s druge potrebom da se u datim uslovima dobije što jasniji fiziološki odgovor. Međutim, u životnoj sredini se pre mogu očekivati značajno manje koncentracije vanadata (Rehder, 2015; Campillo et al., 2002). Kako je u ovom radu pomoću ^{51}V NMR pokazano da se pri koncentracijama manjim od 1mM V(V) pretežno nalazi u obliku monomera (Slika 4. 18), dakle kao mnogo manji molekul, različite geometrije i naelektrisanja u odnosu na tetramer koji je bio dominantan pri do sada ispitivanim koncentracijama, postoji mogućnost da će i interakcija sa gljivom biti unekoliko različita. Stoga je od velikog značaja za razumevanje ponašanja vanadijuma u spoljašnjoj sredini ispitati mehanizme njegove interakcije sa živim bićima i pri nižim i ekološki relevantnijim koncentracijama.

Kako je u slučaju visokih koncentracija V(V) pokazano da je redukcija do V(IV) ključni proces kojim ga gljiva uklanja iz spoljašnje sredine, najpre je ispitano da li je sličan slučaj i sa monomerom. Analogno rezultatima pri visokim koncentracijama V(V), odgovor na ovo pitanje je najpre potražen korišćenjem EPR i ^{51}V NMR metoda, pri čemu je, zbog efekta pH, umesto hranljivog medijuma kao medijum za merenje korišćen HEPES. To nam je omogućilo minimiziranje uticaja pH na redukciju vanadata, sa jedne strane, ali i ograničilo vreme u kojem se tretirana gljiva može ispitivati zbog nedostatka hranljivih materija neophodnih za opstanak gljive (koji se nalaze u hranljivom medijumu). Obe metode (Slike 4. 18., 4. 24. i 4. 25) su pokazale da je redukcija monomera V(V) od strane micelijuma *P. blakesleeanus* praktično zanemarljiva. Ipak, najinformativnije podatke dale su nam metode specijalizovane u smislu osetljivosti za tako niske koncentracije ispitivanog elementa.

Zbog svoje osetljivosti u registrovanju oksidoredukcionih procesa polarografija se nametnula kao metoda izbora. Ne samo da DCP karakteriše 10 puta veća osetljivost u registrovanju V(V) (granične osetljivosti DCP – 0.1 mM, a NMR – 1 mM), već DCP registruje efekte gljive pri čak 100 puta manjoj koncentraciji micelijuma ($2,5 \text{ mg}_{\text{sm}} / \text{ml}$) u odnosu na NMR (oko $250 \text{ mg}_{\text{sm}} / \text{ml}$), usled čega 100 puta manja zapreminska koncentracija V(V) (0.2 mM - DCP prema 20 mM – NMR), kada se on nalazi pretežno kao monomer, rezultuje u istoj koncentraciji u odnosu na masu micelijuma ($80 \text{ } \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$) koja direktno određuje jačinu efekta.

Kako u literaturi nisu nađeni podaci o polarografskom ponašanju vanadijuma u HEPES – u, pre definisanja uticaja gljive neophodno je bilo definisati ponašanje V(V) i V(IV) u ovom puferu.

DCP krive jona V(IV) u puferu karakterišu se katodnim, c_4 i anodnim, a_4 , talasom čije su granične struje linearno zavisne od koncentracije ispitivanog jona, što ukazuje da su difuziono kontrolisani, baš kao što je pokazano i za polarografsko ponašanje V(IV) u amonijačnom medijumu (*Lingane, 1945*). Međutim, polutalasnici potencijali $E_{1/2}$ i jednog i drugog talasa su pomereni ka pozitivnim vrednostima za oko 200 mV u odnosu na odgovarajuće talase u amonijačnom puferu (*Lingane, 1945*), što se može objasniti nižom vrednošću pH u HEPES – u u odnosu na amonijačni pufer. Pokazano je da anodni talas u amonijačnom puferu nastaje kao rezultat jednoelektronske oksidacije V(IV) do V(V), dok je za katodni talas u amonijačnom rastvoru pokazano da je posledica dvoelektronske redukcije V(IV) do V(II) (*Lingane, 1945*). Shodno tome, bilo je za očekivati da odnos I_{kc4} / I_{ka4} u našem eksperimentu bude približno 2. Dobijena vrednost iznosila je 1.7 i najverovatnije je predstavljala posledicu nepreciznog određivanja vrednosti I_d talasa a_4 , usled njegovog preklapanja sa talasom c_4 . Ovaj problem je prevaziđen snimanjem DPP polarograma, koji je dao dva jasno izdvojena pika, a_4 i c_4 , pri čemu je amplituda pika c_4 dvostruko veća u odnosu na amplitudu pika a_4 .

Polarogram jona V(V) u 10 mM HEPES – u odlikuju dva katodna talasa, c_5 i c_5' (Slika 4. 4). Što se tiče talasa c_5' , uzevši u obzir njegov oblik i polutalasnici potencijal $E_{1/2}$, dâ se

zaključiti da odgovara talasu ustanovljenom u fosfatnom medijumu, na $\text{pH} = 7.16$, pripisanom adsorpciono kontrolisanoj, jednoelektronskoj redukciji V(V) do V(IV) (*Filipović et al., 1953*). Nasuprot našim rezultatima, V(V) je u fosfatnom medijumu ispoljio dva difuziono kontrolisana talasa: jedan, koji odgovara redukciji V(V) do V(IV), polutalasnog potencijala $E_{1/2} \sim -0.92 \text{ V}$, i drugi, koji odgovara redukciji V(V) do V(II), polutalasnog potencijala $E_{1/2} \sim -1.5 \text{ V}$ (*Filipović et al., 1953*). Gotovo identične vrednosti polutalasnih potencijala $E_{1/2}$ talasa c_5 i c_4 , kao i znatno viša vrednost konstante difuzione struje I_{kc5} u odnosu na I_{kc4} , idu u prilog činjenici da talas c_5 nastaje kao posledica troelektronske redukcije V(V) do V(II). To zapravo znači da se dva talasa uočena snimanjem u fosfatnom medijumu preklapaju, dajući jedan, c_5 , zabeležen u HEPES – u. Još jednu potvrdu ovoga daje i podatak da je vrednost I_{kc5} vrlo bliska zbiru I_k talasa prisutnih u fosfatnom medijumu (*Filipović et al., 1953*). S druge strane, odnos I_{kc5} / I_{kc4} iznosi 3, odnosno dva puta je veći od odnosa prenesenih elektrona. Polarografske studije V(IV) pokazale su da se sa porastom pH od 3.5 do 9.5 granična struja talasa koji odgovara dvoelektronskoj redukciji V(IV) do V(II) približno duplo smanjuje (*Khan et al., 2006*). Ovo, gotovo dvostruko sniženje granične struje je objašnjeno porastom oligomerizacije V(IV) sa smanjenjem kiselosti medijuma, odnosno formiranjem većih molekula, sa manjim koeficijentom difuzije (*Khan et al., 2006; Lakshminarayanan, 2004*). Štaviše, primenom EPR metode utvrđeno je da je pri neutralnoj pH vrednosti koncentracija monomera V(IV) vrlo niska (*Crans et al., 2013*). Naši rezultati su u velikoj meri u skladu sa ovim podacima, s obzirom da dvostruko niža vrednost I_{kc4} od očekivane ukazuje na to da je većina jona V(IV) u formi dimera ili oligomera.

Dodavanje suspenzije micelijuma *P. blakesleeanus* uzrokuje nestanak svih polarografskih talasa V(IV) u celom opsegu testiranih koncentracija (0.1 – 0.5 mM), koji se može objasniti samo usvajanjem od strane micelijuma *P. blakesleeanus*. Što se tiče mehanizma interakcije V(IV) sa micelijumom *P. blakesleeanus*, već je predloženo da dolazi najpre do adsorpcije jona za ćelijski zid, a zatim i do usvajanja putem neselektivnih katjonskih kanala (*Žižić et al., 2013*). Oba procesa su pasivna, tako da bi bilo za očekivati da će se uspostaviti ravnotežno stanje između V(IV) u spoljašnjem medijumu i onog u citoplazmi gljive.

Potpuni nestanak V(IV) iz vanćelijskog medijuma znači da se očekivana ravnoteža ne uspostavlja i ukazuje na postojanje veoma efikasnog mehanizma, sa visokim kapacitetom za odstranjivanje V(IV) iz citoplazme, što je u skladu sa ranije dobijenim rezultatima (Žižić *et al.*, 2015). Pun kapacitet micelijuma za apsorpciju jona V(IV) nije ustanovljen, ali čak i pri postojećem kapacitetu uklanjanja jona iz rastvora, koji pri najvišoj koncentraciji V(IV) iznosi 185 $\mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$ (9.4 mg / g_{sm}), *P. blakesleaanus* može biti uzeta u razmatranje kao organizam izbora za bioremedijaciju jona V(IV), tim pre što koncentracija od 0.5 mM V(IV) ne utiče na rast gljive (Žižić *et al.*, 2013). Još jedna potvrda navedenog leži u činjenici da *P. blakesleaanus* može da akumulira više vanadijuma u poređenju sa *Coprinus commatus*, poznatim bioakumulatorom vanadijuma (Han *et al.*, 2009).

Za razliku od V(IV), kojeg micelijum u potpunosti uklanja iz spoljašnjeg rastvora, u slučaju V(V) polarografska istraživanja su pokazala da je to smanjenje daleko manje i iznosi oko 27 % u celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija (0.1 – 1 mM). Uzroci smanjenja mogu biti adsorpcija na ćelijskom zidu, redukcija do V(IV), usvajanje od strane gljive ili vezivanje za izvesne materije koje gljiva izlučuje. Naime, gljive su adsorptivni heterotrofi koji u spoljašnju sredinu izlučuju niz enzima i drugih molekula, delimično razlažu hranljive materije i potom ih usvajaju bilo u tom obliku, bilo vezane za nosače koje su takođe izlučile. Imajući to u vidu ne može se zanemariti mogućnost da do smanjenja koncentracije V(V) dolazi upravo zbog njegovog vezivanja za neki od izlučenih molekula. Polarografske tehnike su ranije uspešno primenjivane za *in vivo* merenja bioapsorpcije nekih metala od strane bakterija (Agraz *et al.*, 1994; Savvaidis *et al.*, 1992; Savvaidis *et al.*, 2003). Kao i u slučaju apsorpcije Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} i Zn^{2+} od strane ćelija *Pseudomonas* sp. (Savvaidis *et al.*, 2003; Savvaidis *et al.*, 1992), aktivnost micelijuma *P. blakesleaanus* dovodi samo do snižavanja vrednosti I_d talasa c_5 , bez uticaja na njegov polutaladni potencijal $E_{1/2}$. Ovakvi rezultati isključuju mogućnost stvaranja kompleksa V(V) sa eksudatima gljive, koji su uključeni u procese usvajanja i imobilizacije nekih metala (Baldrian, 2003).

Što se tiče preostala tri razloga smanjenja koncentracije V(V) u rastvoru, prethodna istraživanja EPR i ^{31}P NMR metodama na *P. blakesleaanus* su istakla adsorpciju na ćelijskom zidu i redukciju do V(IV) kao najvažnije, dok je do usvajanja V(V) dolazilo

samo pri visokim koncentracijama (> 7 mM), kada je kapacitet prethodna dva procesa bivao prevaziđen (Žižić *et al.*, 2013). Na osnovu EPR rezultata predloženo je da pri visokim koncentracijama vanadata dominantnu ulogu u redukciji V(V) ima enzim sa fericijanid reduktaznom aktivnošću lokalizovan u ćelijskoj membrani (Žižić *et al.*, 2013). Ovaj zaključak se zasnivao na četiri linije dokaza:

- u prisustvu ekvimolarnih koncentracija fericijanida i vanadata ($35 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$), redukcija V(V) se gotovo u potpunosti zaustavljala, što je objašnjeno većim afinitetom FeCNR prema fericijanidu;
- Cd^{2+} ($20 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$) kao inhibitor FeCNR (Baroja – Mazo *et al.*, 2004) je gotovo u potpunosti inhibirao redukciju V(V);
- EPR eksperimenti na micelijumu koji je tokom dve generacije uzgajan na medijumu bez molibdata su pokazali da je redukcija V(V) značajno inhibirana, što je objašnjeno narušavanjem funkcije Mo – MPT, kofaktora ovog enzima, usled nedostatka molibdena (Žižić *et al.*, 2013);
- aktivnost FeCNR je pokazana u ćelijskoj membrani *P. blakesleeanus* (Baroja – Mazo *et al.*, 2004).

U skladu sa pretpostavkom da bi FeCNR mogla katalizovati najznačajniji deo eventualne redukcije u slučaju submilimolarnih koncentracija V(V) ispitani su efekti fericijanida na uočeno smanjenje I_{dc5} pomoću DCP metode. Fericijanid je dodat u obliku ekvimolarne smeše sa V(V) sa maksimalnom koncentracijom od $0.5 \text{ mM} - 200 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$. Kako, prema našim saznanjima, u literaturi nije opisano polarografsko ponašanje fericijanida u HEPES - u, najpre je izvršena asignacija dobijenih talasa. Dobijeni polarogram je u potpunosti odgovarao prethodnim istraživanjima u 0.05 M NaClO_4 (Kivalo, 1957), tako da je bilo moguće jednoznačno definisati dva talasa, c_3 , koji odgovara difuziono kontrolisanom jednoelektronskoj redukciji do ferocijanida i kojeg karakteriše jako dobro definisan plato, i c_3' u obliku jasno izraženog strujnog maksimuma superponiranog na strujni plato prethodnog talasa. Za praćenje efekta fericijanida od značaja je bio samo talas c_3 pošto je c_3' potpuno nestajao po dodatku gljive. Kako je c_3' adsorpciono kontrolisan i već je pokazano da ga lako uklanja čak i povećanje koncentracije NaClO_4 (Kivalo, 1957), razlog

njegovog nestanka po dodatku gljive može biti posledica površinski aktivnih molekula koje gljiva kao apsorbirajući heterotrof verovatno izlučuje u spoljašnju sredinu. DCP kriva smeše fericianida i V(V) u puferu je pokazala da nema bilo kakve interakcije između c_3 i c_5 talasa, što ga čini pogodnim za praćenje eventualnih efekata gljive. U prisustvu gljive i fericianida smanjenje I_{dc5} je bilo za 30 % manje, ukazujući da oko 8 % V(V) iz spoljašnjeg medijuma biva redukovano do V(IV), dok 18 % biva uklonjeno iz medijuma nekim drugim načinom.

Međutim, osim za FeCNR, fericianid je supstrat i za niz drugih membranskih oksidoreduktaza (Minakami et al., 1962; Chen i Guillory, 1985). Da bi pokazali da li FeCNR katalizuje redukciju monomera V(V), izvršeni su DCP eksperimenti sa Cd^{2+} i micelijumom koji je tokom dve generacije gajen bez molibdata. Ova dva tretmana nisu ispoljila bilo kakav efekat na c_5 talas poreklom od monomera V(V), ukazujući da FeCNR ne katalizuje redukciju monomera V(V) od strane gljive.

Identični rezultati su dobijeni i EPR metodom koja je pokazala da je redukcija V(V) monomera do V(IV) zanemarljiva, u slučaju približno neutralnih pH uslova sredine.

Ako se polarografski rezultati sa Cd^{2+} i odsustvom molibdata posmatraju skupa sa rezultatima EPR i ^{51}V NMR eksperimenata, ne može se isključiti mogućnost da dodavanje fericianida zapravo nije blokiralo redukciju monomera V(V) već neki drugi proces (transport ili vezivanje) kojim je V(V) u odsustvu fericianida uklanjao iz spoljašnjeg medijuma. Dakle, pitanje da li micelijum ima sposobnost redukcije monomera V(V) do V(IV) i dalje ostaje otvoreno, ali nesporno je da čak i ako je ima njen značaj je mnogo manji u odnosu na tetramer.

Još jedan važan oblik interakcije gljive sa V(V) oligomerima jeste i adsorpcija za ćelijski zid (Žižić et al., 2013). Međutim, primenom polarografije i ^{51}V NMR pokazano je da se ćelijski zid odlikuje zanemarljivim kapacitetom za adsorpciju, odnosno akumulaciju V(V) monomera. Iz navedenog se može zaključiti da se najveći deo V(V) monomera transportuje u ćeliju što, je i potvrđeno ^{51}V NMR merenjima. Naime, po dodavanju 1 mM V(V) u svež

micelijum (Slika 4. 18) signal monomera nestaje nakon 90 minuta, dok se u spektru, na – 532 ppm, pojavljuje signal sličnog intenziteta, potekao od intracelularnih komponenti.

Već je ranije pokazano da *Neurospora crassa* poseduje fosfatni transporter visokog afiniteta koji može da transportuje monomer V(V) (Bowman, 1983), a postoje i snažne indicije da je isti obrazac uključen i u unos V(V) u ćelije micelijuma *P. blakesleeanus* (Žižić et al., 2013). Ukoliko je to tako, njegov afinitet za monomer u odnosu na oligomer mora biti znatno veći, s obzirom da influks oligomera postaje merljiv pri koncentracijama V(V) višim od 5 mM (Žižić et al., 2013), dok se u slučaju monomera uočava već pri koncentraciji V(V) od 0.1 mM. Ovo ne iznenađuje jer je monomer vanadata, u pogledu elektronske i fizičke strukture, sličniji fosfatu nego njegovi oligomeri. Takođe, u slučaju *N. crassa* je pokazano da K_m visokoafinitetnog fosfatnog transportera za monomer vanadata iznosi 8 μM (Bowman, 1983).

Na osnovu rezultata iznesenih u ovoj tezi procenjeno je da bi maksimalno usvajanje V(V) iznosilo $104 \pm 2 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$, dok je kapacitet micelijuma za usvajanje V(IV) značajno veći i linearno raste u celom opsegu primenjenih koncentracija (0.1 – 0.5 mM), dostižući vrednost od $185 \pm 12 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$ pri 0.5 mM V(IV) (Slika 4. 9) Ovo ukazuje da je sposobnost micelijuma *P. blakesleeanus* za usvajanje V(V) gotovo dvostruko niža u odnosu na sposobnost usvajanja V(IV). Uprkos tome, ona je i dalje veoma značajna u poređenju sa kapacitetom gljive *C. commatus* (Han et al., 2009). Niži kapacitet usvajanja V(V) u odnosu na V(IV) bi se mogao objasniti uočenim inhibitornim efektom citoplazmatskog V(V) na visokoafinitetni fosfatni transporter kod *N. crassa* (Bowman, 1983; Versaw and Metzberg, 1995). Ova inhibicija se najverovatnije odvija indirektno, posredstvom inhibicije membranske H^+ ATPaze (Slayman et al., 1990), što za posledicu ima depolarizaciju ćelijske membrane (Bowman, 1983).

Pored značajnog kapaciteta za usvajanje V(V) i V(IV) micelijum *P. blakesleeanus* je pokazao i značajan kapacitet za usvajanje Cd^{2+} , pošto je pri njegovoj koncentraciji od 1mM – 400 $\mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$ smanjio I_{dCd} za čak 82 % (Slika 4. 13. B), što znači da je usvojio oko 330

$\mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}} \text{Cd}^{2+}$. Sve ovo ističe *P. blakesleeanus* kao mogućeg kandidata za bioremedijatora ovih veoma toksičnih metala (Maley, 1996).

Ukratko, polarografska ispitivanja su pokazala da je micelijum *P. blakesleeanus* odličan bioakumulator kadmijuma i vanadijuma u oba njegova, fiziološki relevantna, oksidaciona stanja. Nije utvrđeno ekstracelularno formiranje kompleksa monomera V(V) sa ćelijskim eksudatima, niti njegova adsorpcija za ćelijski zid, dok je redukcija od strane micelijuma, ukoliko uopšte postoji, samo od marginalnog značaja. Prema tome, osnovni oblik interakcije monomera vanadata V(V) sa micelijumom je transport u ćeliju gljive, verovatno posredstvom fosfatnog transportera.

Prisustvo jedinog signala, na -532 ppm u spektru snimljenom 35 minuta nakon dodavanja rastvora koji je sadržao isključivo monomer V(V) ide u prilog navedenoj pretpostavci. Ovi rezultati su u skladu sa onim dobijenim na eritrocitima (Delgado et al., 2005) i prvi su koji rasvetljavaju koja vrsta V(V) zapravo ulazi u ćeliju kad je reč o nižim gljivama. Signal koji je uočen na -532 ppm daleko je od hemijskog pomaka karakterističnog za monomer (-559 ppm pri neutralnom pH). S obzirom da se intracelularni pH procenjuje kao neznatno kiseo (Žižić et al., 2014) (iz položaja signala Pi u ^{31}P NMR spektru), signal monomera V(V) trebalo bi da ima sličan hemijski pomak. Ovo jasno eliminiše mogućnost da je vanadat, dodat na početku, još uvek prisutan u micelijumu, i potvrđuje promene u simetriji i stvaranju kompleksa vanadijuma unutar ćelije.

Formiranje intracelularnih kompleksa moglo bi biti glavni razlog rezistentnosti koju *P. blakesleeanus* ispoljava na visoke koncentracije V(V) u hranljivom medijumu. Formiranje kompleksa moglo bi i da sprečava redukciju vanadata, kao i njegovu oligomerizaciju do dekamera, pri fiziološkim, intracelularnim vrednostima pH (Aureliano, 2016). Položaj signala ovog kompleksa u spektru koincidira sa hemijskim pomakom nekoliko vanadatnih kompleksa (Gresser and Tracey, 1986a; Gresser and Tracey 1986b), ali za identifikaciju ovih vrsta su neophodna dalja istraživanja. Posebno je interesantna mogućnost vezivanja za male unutarćelijske molekule kao što su citrati i laktati koji su u micelijumu *P. blakesleeanus* zastupljeni u velikom procentu (Rua et al., 1987). Naime, i citrat i laktat

poseduju kapacitet za formiranje kompleksa sa monomerom vanadata (V1), koji se u ^{51}V NMR spektru uočavaju na oko -531 ppm (Gorzsás et al., 2004; Gorzsás et al., 2003). Formiranje V1 – laktat kompleksa događa se pri jako niskim vrednostima pH (pH = 1 – 3), dok se V2 – laktat kompleks, sa konstantnim hemijskim pomakom na oko -533 ppm, uočava na pH vrednostima od kiselih do neutralnih (Gorzsás et al., 2003). Imajući u vidu da laktat predstavlja dominantan glikolitički metabolit u micelijumu *P. blakesleeanus* (Rua et al., 1987), V1 – laktat kompleks mogao bi biti dobar kandidat za nepoznati kompleks vanadata. S druge strane, pH – zavisni V1 – citrat kompleks ispoljava signal na oko -531 ppm pri približno neutralnim uslovima pH (Gorzsás et al., 2004).

Rezultati dobijeni primenom ramanske spektroskopije idu u prilog hipotezi baziranoj na rezultatima XANES metode na *P. blakesleeanus* (Žižić et al., 2015), a tiču se formiranja kompleksa vanadijuma u ćeliji i ukazuju na njegova vezujuća mesta.

Istraživanja interakcija metala sa biološki relevantnim molekulima pomoću ramanske spektroskopije su uglavnom limitirana na interakcije DNK ili proteina sa metalima (Ferrer et al., 2008; Duguid et al., 1993; Duguid et al., 1995; Langlais et al., 1990), dok se na interakcije metala sa biološkim tkivom odnosi samo jedno (Palaniappan and Pramod, 2011). Prema dostupnim podacima, vezivanje prelaznih metalā za DNK ili proteine manifestuje se promenom intenziteta $i /$ ili frekvencije određenih Ramanovih traka. Imajući ovo u vidu, rezultati prikazani na Slici 4. 26. mogu se pripisati vezivanju $i /$ ili interakciji vanadata sa komponentama ćelijskog zida, što je pokazano porastom intenziteta trake na 1635 cm^{-1} , odnosno sniženjem na 1523 cm^{-1} . Ove trake odgovaraju vibracijama veza u polisaharidima hitozanu i hitinu u ćelijskom zidu (De Gussem et al., 2005). Ostali značajni molekuli uključeni u vezivanje vanadata mogli bi biti polifosfati i fosfati, kao što je pokazano porastom intenziteta traka na 688 , 1156 i 1190 cm^{-1} (Bednarova et al., 2012). Takođe, porast intenziteta trake na 1447 cm^{-1} , ukazuje da se u razmatranje mogu uzeti i interakcije vanadijuma sa molekulima kao što su polisaharidi, proteini $i /$ ili lipidi (Žižić et al., 2015). Sve promene ustanovljene u ramanskim spektrima idu u prilog pretpostavci o postojanju kompleksa vanadijuma unutar ćelije.

Generalno, vanadijum usvojen od strane micelijuma *P. blakesleeanus* akumulira se u središnjim delovima hifa, najverovatnije u vakuoli, dok se manje količine vanadijuma mogu uočiti u perifernim oblastima hifa (Žižić *et al.*, 2015; Richards *et al.*, 2010).

Kada je reč o rezultatima dobijenim biohemijskim metodama izolacije i prečišćavanja ćelijske membrane, uprkos tome što je sistem bio problematičan za izolaciju ipak smo uspeali da dobijemo membrane prihvatljive čistoće. Iako češće korišćena za izolaciju ćelijske membrane kod gljiva, metoda diferencijalnog centrifugiranja u slučaju micelijuma *P. blakesleeanus* nije omogućila izolaciju frakcije obogaćene ćelijskom membranom, ali je izolacija na dvofaznom sistemu (PEG / Dextran) omogućila izolaciju ćelijske membrane prihvatljive čistoće za biohemijska ispitivanja. Ove membrane su pokazivale FeCNR aktivnost, koja je u nekim izolatima bila blago inhibirana 1 mM V(V), što ukazuje na moguću kompeticiju sa fericijanidom.

Summa summarum, interakciju micelijuma *P. blakesleeanus* i vanadata, kao i vanadijuma uopšte, nije lako sasvim detaljno objasniti. U ovoj tezi, shodno limitirajućim svojstvima dostupnih tehnika, izloženi su oblici V(V) detektovani u micelijumu, vreme njihovog nastanka, kao i mogućnosti vezivanja za ćelijske komponente, kako ćelijski zid i membranu, tako i one unutar same ćelije. Ona predstavlja i prvi pokušaj specijacije vanadata u nižim gljivama *in vivo*. S obzirom na izbor tehnike polarografije, posebno je, u prvom delu, obraćena pažnja na svojstva i „sudbinu“ monomera vanadijumovih jona u prisustvu micelijuma. Predložen je i jedan vid uticaja monomera vanadata na fosfatni metabolizam i njegovo formiranje kompleksa unutar ćelije, zatim redukcija / vezivanje tetramera preko FeCNR.

Dekamer vanadata, koji, u odnosu na monomer ispoljava suprotan efekat na kinaze (Aureliano, 2016), u micelijumu *P. blakesleeanus* nije detektovan. S obzirom na značajne efekte oligomernih formi vanadata ovo istraživanje može predstavljati podstrek za buduće studije koje bi se ticale otpornosti *P. blakesleeanus* na ekstracelularne milimolarne koncentracije vanadata, njegove uloge u poboljšanju antidijabetskih svojstava nekih vrsta gljiva, kao i njegovih insulin – mimetičkih, ali i toksičnih efekata na različita izolovana

tkiva. Sa ovde dobijenim rezultatima, zajedno sa onim dobijenim ranije, korak smo bliže kompletiranju slike o interakciji gljiva sa ovim esencijalnim mikroelementom.

6. ZAKLJUČCI

Osnovni zaključci koji proizilaze iz ove doktorske disertacije su:

1. Primenom ^{51}V NMR je pokazano da je pri visokim koncentracijama ($80 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$) tetramer osnovna V(V) vrsta koja podleže redukciji. Redukcija je inhibirana u velikoj meri prisustvom fericijanida i Cd^{2+} , čime su potvrđeni EPR rezultati koji su ukazivali da je FeCNR osnovni enzim uključen u proces redukcije i pokazano da mu je tetramer V(V) osnovni supstrat. Sa druge strane utvrđeno je da gljiva usvaja vanadat u njegovom izvornom oksidacionom obliku, koji gradi kompleks sa nekim unutarćelijskim organskim jedinjenjem.
2. Polarografska istraživanja su pokazala da micelijum gljive *P. blakesleeanus* smanjuje koncentraciju V(V) monomera u spoljašnjem rastvoru za oko 27 % u celokupnom opsegu ispitivanih koncentracija (0.1 – 1 mM).
3. Polarografski eksperimenti sa fericijanidom ukazuju da je oko 8 % V(V) iz spoljašnjeg medijuma redukovano do V(IV), a 18 % uklonjeno iz medijuma na neki drugi način, dok potpuno odsustvo efekta Cd^{2+} ukazuje da redukcija nije katalizovana FeCNR. Štaviše, u EPR eksperimentima nije registrovana značajna redukcija monomera V(V).
4. Polarografska ispitivanja su pokazala da uzrok smanjenja koncentracije V(V) monomera nije ekstracelularno formiranje kompleksa monomera V(V) sa ćelijskim eksudatima, a u kombinaciji sa ^{51}V NMR rezultatima da značajan doprinos ne daje ni adsorpcija za ćelijski zid.
5. ^{51}V NMR merenja su pokazala da po dodavanju 1 mM V(V) u micelijum signal monomera nestaje dok se u spektru pojavljuje signal sličnog intenziteta, potekao od intracelularnih komponenti (-532 ppm) što ukazuje da je osnovni oblik interakcije monomera vanadata V(V) sa micelijumom transport u ćeliju.
6. Micelijum gljive *P. blakesleeanus* u potpunosti usvaja V(IV) iz rastvora, što se manifestuje kao potpun nestanak polarografskih talasa V(IV) i, već pri ovde određenom kapacitetu usvajanja, ona može biti uzeta u razmatranje kao snažan agens za bioremedijaciju kad se radi o jonima V(IV).

7. Polarografska ispitivanja su pokazala da je micelijum *P. blakesleeanus* jako dobar bioakumulator V(IV) ($185 \pm 12 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$), V(V) ($104 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{g}_{\text{sm}}$) i Cd^{2+} ($330 \mu\text{mol} / \text{g}_{\text{sm}}$), što otvara mogućnosti za dalja ispitivanja njenih bioremedijatorskih sposobnosti.
8. Rezultati dobijeni primenom ramanske spektroskopije ukazuju na formiranje kompleksa vanadijuma u ćeliji najverovatnije sa polifosfatima i polisaharidima.
9. Pokušana je i biohemijska karakterizacija FeCNR, međutim pokazalo se da izolaciju ćelijske membrane iz hifa prati niz tehničkih poteškoća, usled kojih nije bila moguća izolacija dovoljne količine membrana. Optimizacijom metode dobijen je izolat membrana prihvatljive čistoće i pokazano je da one sadrže FeCNR aktivnost, međutim nije nedvosmisleno potvrđeno da li ovaj enzim učestvuje u redukciji V(V).

7. LITERATURA

- Agraz, R., Van der Wal, A., Van Leeuwen, H. P. 1994. Voltammetric study of the interaction of cadmium with bacterial cell. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 34: 53–59.
- Amado, A. M., Aureliano, M., Ribeiro – Claro, P. J. A., Teixeira – Dias, J. C. 1993. Combined Raman and ^{51}V NMR spectroscopic study of vanadium (V) Oligomerization in aqueous alkaline solutions. *J. Raman Spectrosc.* 24: 699 – 703.
- Antipov, A.N., Lyalikova, N. N., L'vov, N.P. 2000. Vanadium - Binding Protein Excreted by Vanadate - Reducing Bacteria. *IUBMB life.* 49(2): 137-141.
- Aureliano, M. 2016. Decavanadate Toxicology and Pharmacological Activities: V_{10} ili V_1 , Both or None? *Oxid. Med. Cell. Longev.* [http. // dx. doi. org/ 10. 1155 / 2016/ 6103457](http://dx.doi.org/10.1155/2016/6103457).
- Bakás, L., Verza, G., Cortizo, A. 2000. Effect of Vanadium Compounds on the Lipid Organization of Liposomes and Cell Membranes. *Biol. Trace Elem. Res.* 80: 269 – 279.
- Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 78–91.
- Baldwin, D., McCabe, M., Thomas, F. 1984. The respiratory gas carrying capacity of ascidian blood. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A (3): 479 – 482.
- Barbier, G. G. and Campbell, W. H. 2005. Viscosity effects on eukaryotic nitrate reductase activity. *J. Biol. Chem.* 280: 26049-26054.
- Bar – Nun, N., Scholnick, S., Mayer, A. M. 2002. Presence of vanadium – dependent haloperoxidase in *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol. Lett.* 217: 121 – 124.
- Baroja – Mazo, A., Del Valle, P., Rúa, J., Busto, F., De Cima, S., De Arriaga, D. 2004. A Transplasma Membrane Redox System in *Phycomyces blakesleeanus*: properties of a Ferricyanide Reductase Activity Regulated by Iron Level and Vitamin K_3 . *J. Bioenerg. Biomembr.* 36: 481 – 492.

- Barry, N.P.E. and Sadler, P. J. 2013. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. *Chem. Commun.* 49: 5106 – 5131.
- Bednarova, L., Palacky, J., Bauerova, V., Hruskova – Heidingsfeldova, O., Pichova, I., Mojzes, P. 2012. Raman microspectroscopy of yeast vacuoles. *Spectrosc. Int. J.* 27: 503 – 507.
- Beiling, H. - J., Jost, E., Pflieger, K., Rummel, W., Seifen, E. 1961. Aufnahme und Verteilung von Vanadin beider Tunicate *Phallusia mammillata* Cuvier (Untersuchungenuber Hamovanadin, V). *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.* 325: 122 – 131.
- Bergman, K., Burke, P. V., Cerdá – Olmedo, E., David, C. N., Delbrück, M., Foster, K. W., Goodell, E. W., Heisenberg, M., Meissner, G., Zalokar, M., Dennison, M. S., Shropshire, W. JR. 1969. Phycomyces. *Bacteriological Reviews.* 33 (1): 99 – 157.
- Bernard – Ortiz, I., Anderson, R. T., Vrionis, H. A., Lovley, D. L. 2004. Vanadium Respiration by *Geobacter metallireducens*: Novel Strategy for In Situ Removal of Vanadium from Groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (5): 3091 – 3095.
- Bernhardt, P., Okino, T., Winter, J. M., Miyanaga, A., Moore, B. S. 2011. A Stereoselective vanadium – dependent Chloroperoxidase in Bacterial Antibiotic Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 133: 4268 – 4270.
- Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Peschek, G. A., Obinger, C. 2009. Occurrence, phylogeny, structure, and function of catalases and peroxidases in cyanobacteria. *J. Exp. Bot.* 60 (2): 423 – 440.
- Berry, R. E., Armstrong, E. M., Beddoes, R. L. Collinson, D., Ertok, S. N., Helliwell, M., Garner, C. D. 1999. The Structural Characterization of Amavadin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (6): 795 – 797.
- Biermann, W. J. and Wong, W – K. 1963. Polarography of vanadium(II) complexes. *Can. J. Chem.* 41(10): 2010 – 2015.

- Bode, H – P., Friebel, C., Fuhrmann, G. F. 1990. Vanadium uptake by yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1022: 163 - 170.
- Boison, G., Steingen, C., Stal, J. L., Bothe, H. 2006. The rice field cyanobacteria *Anabaena azotica* and *Anabaena* sp. CH1 express vanadium – dependent nitrogenase. *Arch. Microbiol.* 186: 367 – 376.
- Bowman, B. J. 1983. Vanadate uptake in *Neurospora crassa* occurs via phosphate transport system. *J. Bacteriol.* 153: 286 – 291.
- Bradford, M.M. 1976. Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 72: 248.
- Bronkema, J. L. and Bell, A. T. 2008. An investigation of the reduction and reoxidation of isolated vanadate sites supported on MCM – 48. *Catal. Lett.* 122: 1 – 8.
- Cammack, R. 1986. A role for vanadium at last. *Nature.* 322: 312.
- Campillo, N., López-García, I., Viñas, P., Arnau-Jerez, I., Hernández-Córdoba, M. 2002. Determination of vanadium, molybdenum and chromium in soils, sediments and sludges by electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sample introduction. *J. Anal. At. Spectrom.* 17: 1429-1433.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. and Gooday, W. G. (2001). *The Fungi.* 2nd. ed. London. Academic Press.
- Carpentier, W., De Smet, L., Beeumen Van, J., Brigé, A. 2005. Respiration and Growth of *Shewanella oneidensis* MR – 1 Using Vanadate as the Sole electron Acceptor. *J. Bacteriol.* 180 (10): 3293 – 3301.
- Carpentier, W., Sandra, K., De Smet, I., Brigé, A., De Smet, L., and Van Beeumen, J. 2003. Microbial Reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (6): 3636 – 3639.

Carreras, J., Bartons, R., Grisolia, S. 1980. Vanadate inhibits 2, 3 – bisphosphoglycerate dependent mutases but does not affect 2, 3 – bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1267 – 1273.

Cerdá – Olmedo, E. and Lipson, E.D. eds. (1987). *Phycomyces*. Cold Spring: Harbor Laboratory.

Chen, S. and Guillory, R. J., 1985. Studies of the ferricyanide reductase activities of the mitochondrial reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ubiquinone reductase (complex I) utilizing arylazido- β -alanyl NAD⁺ and arylazido- β -alanyl NADP⁺. *J. Bioenerg. biomembr.* 17(1): 33-49.

Coşkun, E., Biçer, E., Bulut, İ. 2015. Electrochemical and spectral studies of the interaction of niplumic acid with metavanadate (VO³⁺) ions. *Int. J. Electrochem. Sci.* 10: 9216–9231.

Cohen, N., Halberstam, M., Shlimovich, P., Chang, C. J., Shamoon, H., Rosetti, L. 1995. Oral Vanadyl Sulfate Improves Hepatic and Peripheral Insulin Sensitivity in Patients with Non – Insulin – dependent Diabetes Mellitus. *J. Clin. Invest.* 95: 2501 – 2509.

Crans, D. C., Woll, K. A., Prusinskas, K., Johnson, M. D., Norkus, E. 2013. Metal speciation in health and medicine represented by iron and vanadium. *Inorg. Chem* 52:12262–12275.

De Gussem, K., Vandenabeele, P., Verbeken, A., Moens., L. 2005. Raman spectroscopic study of *Lactarius* spores (*Russulales*, Fungi). *Spectrochim. Acta. A.* 61: 2896 – 2908.

Delgado, T. C., Tomaz, I. A., Correia, I., Costa Pessoa, J., Jones, J. G., Geraldés, C. F. G. et al. 2005. Uptake and metabolic effects of insulin mimetic oxovanadium compounds in human erythrocytes. *J. Inorg. Biochem.* 99: 2328 – 2339.

Dingley, A. L., Kustin, K., Macara, I. G., McLeod, G. C., 1981. Accumulation of vanadium blood cells occurs via a specific anion transport system. *Biochim. Biophys. Acta.* 649: 493 – 502.

Duguid, J. G, Bloomfield, V. A., Benevides, J. M., Thomas, G. J. Jr. 1995. Raman Spectroscopy of DNA – Metal complexes I. The thermal denaturation of DNA in presence of Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} . *Biophys. J.* 69: 2623 – 2641.

Duguid, J., Bloomfield, V. A., Benevides, A. J., Thomas, G. J. Jr. 1993. Raman Spectroscopy of DNA – Metal complexes I. Interactions and conformational effects of divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd and Cd. *Biophys. J.* 65: 1916 – 1928.

Eide, D. and Guerinot, M. L. 1997. Metal ion uptake in eukaryotes. *Am. Soc. Microbiol. News.* 63: 199–205.

Ferrer, E. G., Bosch, A., Yantornob, O. J., Barana, E. J. 2008. A spectroscopy approach for the study of the interactions of bioactive vanadium species with bovine serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.* 16: 3878 – 3886.

Filipović, I., Hahl, Z., Gašparac, Z., Klemenčić, V. 1953. Polarographic Characteristics of +5 Vanadium in Phosphate, Borate and Carbonate Buffers. *J. Am. Chem. Soc.* 76(8): 2074 – 2080.

Fraústo da Silva, J. J. R. 1989. Vanadium in biology – the case of *Amanita* toadstools. *Chem. Spec. Bioavail.* 1: 139 – 150.

Gadd, G. M. and Sayer, G. M. (2000). Fungal transformations of metals and metalloids. In: D. R. Lovley, ed. 2000. *Environmental Microbe – Metal Interactions*. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 237– 256.

García, B. G., Quiroga, A. D., Stürtz, N., Martinez, A. I., Biancardi, M. E. 2015. Morphological Alterations of Central Nervous System (CNS) Myelin in Vanadium (V) – Exposed Adult Rats. *Drug Chem. Toxicol.* 27 (3): 281 – 293.

Gerke, T. L., Scheckel, K. G., Shock, M. R. 2009. Identification and Distribution of Vanadinite ($\text{Pb}_5(\text{V}^{5+}\text{O}_4)_3\text{Cl}$) in Lead Pipe Corrosion By – Products. *Environ. Sci. Technol.* 43 (12): 4412 – 4418.

Gharieb, M. M., Kierans, M., Gadd, G. M. 1999. Transformation and tolerance of tellurite by filamentous fungi: accumulation, reduction, and volatilization. *Mycological Research*. 103: 299–305.

Goldfine, A. B., Simonson, D. C., Folli, F., Patti, M. E., Kahn, C. R. 1995. Metabolic effects of sodium metavanadate in humans in insulin – dependent and noninsulin - dependent diabetes mellitus in *in vivo* and *in vitro* studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3311 – 3320.

Gomez – Foix, A. M., Rodriguez – Gil, J. E., Fillat, C., Guinovart, J. J., Bosch, F. 1988. Vanadate raises fructose 2, 6 – bisphosphate concentrations and activates glycolysis in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 255: 507 – 512.

Gordon, J. 2001. Use of vanadate as protein – phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* 201: 477 – 482.

Gorzsás, A., Getty, K., Andersson, I., Petterson , L. 2004. Speciation in the aqueous $H^+ / H_2VO_4^- / H_2O_2 /$ citrate system of biomedical interest. *Dalton Trans.* 2873 – 2882.

Gorzsás, A., Getty, K., Andersson, I., Petterson , L. 2003. Speciation in the aqueous $H^+ / H_2VO_4^- / H_2O_2 /$ lactate system of biomedical interest. *Dalton Trans.* 2503 – 2511.

Gresser, M. J., Tracey, A. S., Parkinson, K. M. 1986. Vanadium (V) oxyanions: The interaction of vanadate with pyrophosphate, phosphate and arsenate. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 6229 – 6234.

Gresser, M. J. and Tracey, A. S. 1986. Vanadium (V) oxyanions: formation of cyclic esters ethylene glycol. *J. Am. Chem. Soc.* 108: 1935 – 1939.

Gresser, M. J. and Tracey, A. S. 1985. Vanadium (V) oxyanions: The esterification of ethanol with vanadate. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 4215 – 4220.

- Hamada, T., Asanuma, M., Ueki, T., Hayashi, F., Kobayashi, N., Yokoyama, S., Michibata, H., Hirota, H. 2005. Solution Structure of Vanabin2, a Vanadium(IV) – Binding Protein from the Vanadium – Rich Ascidian *Ascidia sydneinensis samea*. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 4216 – 4222.
- Han, C., Cui, B., Qu, J. 2009. Comparison of vanadium - rich activity of three species fungi of basidiomycetes. *Biol. Trace. Elem. Res.* 127: 278–283.
- Henze, M. 1911. Untersuchungenuber das blut der Ascidien. I. Mitteilung. Die Vanadiumverbindung der Blutkörperchen. *Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem.* 72:494-501.
- Hodkinson, B. P., Allen, J. L., Forrest, L. L., Goffinet, B., Sérusiaux, E., Andresson, O. S., Miao, V., Bellenger, JP., Lutzoni, F. 2014. Lychen – symbiotic cyanobacteria associated with *Peltigera* have an alternative vanadium – dependent nitrogen fixation system. *Eur. J. Phycol.* 49(1): 11 – 19.
- Ishii, T., Otake, T., Okoshi, K., Nakahara, M., Nakmura, R. 1994. Intracellular localization of vanadium in the fan worm *Pseudopotamilla ocellata*. *Mar. Biol.* 121 (1): 143 – 151.
- Ishii, T., Nakai, I., Numako, C., Otake, T. 1993. Discovery of a new vanadium accumulator, the fan worm *Pseudopotamilla ocellata*. *Naturwissenschaften.* 80 (6): 268 – 270.
- Ishii, T. (1998). Characterization of Vanadium in the Fan Worm *Pseudopotamilla ocellata*. In: J. O. Nriagu, ed. 1998. *Vanadium in the Environment, Part 1: Chemistry and Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Jensen, H. L. and Spencer, D. 1947. The Influence of molybdenum and vanadium on nitrogen fixation by *Clostridium butyricum* and related organisms. *Proc. Linnean Soc. N.S.W.* 72: 73 – 87.

Jordan, P., and Vilter, H. 1991. Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages: Partition and fractionation of vanadate – dependent bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. Saccharina* in aqueous polymer two – phase system. *Biochim. Biophys. Acta.* 1073: 98 – 106.

Kaysser, L., Bernhardt, P., Nam, S. – J., Loesgen, S., Ruby, J. G., Skewes – Cox, P., Jensen, P. R., Fenical, W., Moore, B. S. 2012. Merochlorins A – D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium – dependent chloroperoxidases. *J. Am. Chem. Soc.* 134: 11988 – 11991.

Khan, A. R., Crans, D. C., Pauliukaite, R., Norkus, E. 2006. Spectrometric and Electrochemical Investigation of Vanadium(V) and Vanadium(IV) Tartrate Complexes in Solution. *J. Braz. Chem. Soc.* 17(5): 895 – 904.

Kierans, M., Staines, A . M., Bennett, H., Gadd, G. M. 1991. Silver tolerance and accumulation in yeasts. *Biol. Met.* 4: 100 – 106.

Kim, C., Crane, F. L., Faulk, W. P. and Morr e, D. J. 2002. Purification and characterization of a doxorubicin-inhibited NADH - quinone (NADH - ferricyanide) reductase from rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 277 (19): 16441 - 16447.

Kivalo, P. 1957. Polarography of the Ferricyanide Ion in the Absence of Inert Electrolyte. *J. Phys. Chem.* 61(8): 1126 – 1127.

Kjellbom, P., Larsson, C. 1984. Preparation and polypeptide composition of chlorophyll – free plasma membranes from leaves of light - grown spinach and barley. *Physiol. Plant.* 62: 501 – 509.

Kolthoff, I. M. and Lingane, J. J. (1946). *Polarography*. New York. Interscience Publishers. Inc. New York.

Kosman, D. J. (1994). Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi. In: G. Winkelmann and D. R. Winge, eds. 1994. *Metal Ions in Fungi*. New York: Marcel Dekker, pp. 1–38.

- Langlais, M., Tajmir – Riahi, H. A. Savoie, R. 1990. Raman Spectroscopic Study of the effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} ions on Calf Thymus DNA: Binding sites and conformational changes. *Biopolymers*. 30: 743 – 752.
- Lakshminarayanan, V. 2004. Polarography. *Resonance*. 9(9): 51 – 61.
- Lesuisse, E. and Labbe, P. 1995. Effects of cadmium and of YAP1 and CAD1/YAP2 genes on iron metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 141: 2937 – 2943.
- Levina, A., McLeod, A. I., Lay, P. A. 2014. Vanadium speciation by XANES spectroscopy: a three – dimensional approach. *Chem. Eur. J.* 20: 12056 – 12060.
- Lingane, J. J., Meites, L. 1948. Polarographic Characteristics of +2 and +3 Vanadium. I. Polarography in Non - complexing Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 70(7): 2525 – 2529.
- Lingane, J. J. 1945. Coulometric Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* 67(11): 1916 – 1922.
- Lippmann von, E. O. 1888. Uebereinigteseltene Bestandtheile der Rübenasce. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 21(2): 3492 – 3493.
- Lyalkova, N.N. and Yurkova, N.A. 1992. Role of microorganisms in vanadium concentration and dispersion. *Geomicrobiol.J.* 10(1): 15 - 26.
- Macara, I. G. and McLeod, G.C. 1979. Vanadium in tunicates: oxygen – binding studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 62A: 821 – 826.
- Maley, D. F. 1996. Cadmium whole - lake experiment at the Experimental Lakes Area: an anachronism? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53: 1862- 1870.
- Marriott, M. S. 1975. Enzymic Activity of Purified Plasma Membranes from the Yeast and Mycelial forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 89: 345 – 352.

Manazzu, I., Guerra, E., Ferreti, R., Pediconi, D. Fatichenti, F. 2000. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress in the vanadate – tolerante yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1475: 151 – 156.

Mannazzu, I., Guerra, I., Strabbioli, R., Masia, A., Maestrone, G.B., Zoroddu, M. A. Fatichenti, F. 1997. Vanadium affects vacuolization and phosphate metabolism in *Hansenula polymorpha*. *FEMS Microbiology*. 147: 23-28.

Michibata, H., Yamaguchi, N., Uyama, T., Ueki, T. 2003. Molecular biological approaches to the accumulation and reduction of vanadium by ascidians. *Coord. Chem. Rev.* 237: 41 – 51.

Minakami, S., Rinhler, R. L., Singer, T. P. 1962. Studies on the Respiratory Chain – linked Dihydrodiphosphopyridine Nucleotide Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 237(2): 769 – 576.

Morley, G. F., Sayer, J. A., Wilkinson, S. C., Ghareib, M. M., Gadd, G. M. (1996). Fungal sequestration, mobilization, and transformation of metals and metalloids. In: J. C. Frankland, N. Magan, G. M. Gadd, eds. 1996. *Fungi and environmental change*. Cambridge, New York: Cambridge University Press, pp. 235 - 256.

Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. U. 2007. Raman Spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 42: 493 – 541.

Myers, J. M., Antholine, W. E., Myers, C. L. 2004. Vanadium(V) Reduction by *Shewanella oneidensis* MR – 1 Require Menaquinone and Cytochromes from Cytoplasmic and Outer Membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (3): 1405 – 1412.

Palaniappan, P. L. R. M. and Pramod K. S. 2011. Raman spectroscopic investigation on the microenvironment of the liver tissues of Zebrafish (*Danio rerio*) due to titanium dioxide exposure. *Vib. Spectrosc.* 56: 146 – 153.

- Persoon, I. P., Hoogenkamp, M. A., Bury, A., Wesselink, P. R., Hartog, A. F., Wever, R., Crielaard, W. 2012. Effect of Vanadium Chloroperoxidase on *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J. Endod.* 38: 72 – 74.
- Plat, H., Krenn, B. E. Wever, R. 1987. The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoriaparietina* is a novel vanadium enzyme. *Biochem. J.* 248 (1): 277 – 279.
- Priestley, J. 1876. On the Physiological Action of Vanadium. *Philos. Trans. R. Soc. London.* 166: 495 – 556.
- Puri, S., Dubey, R. K., Gupta, M. K., Puri, B. K. 1998. Differential pulse polarographic determination of trace amounts of vanadium and molybdenum in various standard alloys and environmental samples after preconcentration of their morpholine–4-carbodithioates on microcrystalline naphthalene or morpholine–4-dithiocarbamate cetyltrimethyl-ammonium bromide-naphthalene adsorbent. *Talanta.* 46: 655–664.
- Ramadan, S. E., Razak, A. A., Yousseff, Y. A., Sedky, N. M. 1988. Selenium metabolism in a strain of *Fusarium*. *Biol. Trace Elem. Res.* 18: 161–170.
- Rehder, D. 2015. The role of vanadium in biology. *Metallomics.* 7: 730 – 742.
- Rehder, D. 2013. The future of / for vanadium. *Dalton Trans.* 42: 11749 – 11761.
- Rehder, D. 2012. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future Med. Chem.* 4 (14): 1823 – 1837.
- Rehder, D. *Bioinorganic Vanadium Chemistry*. Chichester, John Wiley and Sons, 2008.
- Renirie, R., Dewilde, A., Pierlot, C., Wever, R., Hober, D., Aubry, J. M. 2008. Bactericidal and virucidal activity of the alkalophilic P395D/L241V/T343A mutant of vanadium chloroperoxidase. *J. Appl. Microbiol.* 105(1): 264 – 270.

- Ribeiro, A. C. F., Valente, A. J. M., Lobo, V. M. M., Azevedo, E. F. G., Amado, A. M., Da Costa, A. M. A., Ramos, M. L., Burrows, H. D. 2004. Interactions of vanadates with carbohydrates in aqueous solutions. *J. Mol. Struct.* 703: 93 – 101.
- Richards, A., Veses, V., Gow NAR. 2010. Vacuole dynamics in fungi. *Fungal. Biol. Rev.* 24: 93 – 105.
- Rider, M. H., Bartrons, R., Hue, L. 1990. Vanadate inhibits liver fructose – 2, 6 – bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 190: 53 – 56.
- Robson, R. L., Eady, R. R., Richardson, T. H., Miller, R. W., Hawkins, M., Postgate, J. R. 1986. The alternative nitrogenase of *Azotobacter croccocumis* a vanadium enzyme. *Nature.* 322: 388.
- Rodríguez - Gil, J. E., Gómez – Foix, A. M., Fillat, C., Bosch, F., Guinovart, J. J. 1991. Activation by Vanadate of Glycolysis in Hepatocytes From Diabetic Rats. *Diabetes.* 40(10): 1355 – 1359.
- Rojas – Romo, C., Arancibia, V., Moreno – da Costa, D., Tapia, R. A. 2016. Highly sensitive determination of vanadium (V) by catalyticadsorptive stripping voltammetry. Substituent effect on sensitivity III. *Sensor Actuat. B – Chem.* 224: 772–779.
- Rua, J., Rodriguez – Aparacio, L. B., Busto, F., Soler, J. 1987. Effect of light on several metabolites of carbohydrate metabolism in *Phycomyces blakesleanus*. *J. Bacteriol.* 904 – 907.
- Ryan, D. E., Ghatlia, N. D., McDermott, A. E., Turro, N. J. and Nakanishi, K. 1992. Reactivity of tunichromes: Reduction of vanadium(V) and vanadium(IV) to vanadium(III) at neutral pH. *J. Am. Chem. Soc.* 114:9659–9660.
- Savvaidis, I., Hughes, M. N., Poole, R. K. 2003. Differential pulse polarography: a method for the direct study of biosorption of metal ions by live bacteria from mixed metal solutions. *Antonie van Leeuwenhoek.* 84: 99 – 107.

Savvaidis, I., Hughes, M. N., Poole, R. K. 1992. Differential pulse polarography: a method of directly measurement of metal ions by live bacteria without separation of biomass and medium. *FEMS Microbial. Let.* 92: 181–186.

Slayman, C. L., Kaminski, P., Stetson, D. (1990). Structure and function of fungal plasma-membrane ATPases. In: Kuhn, P. K., Trinci, A. P. J., Jung, M. J., Goosey, M. W., Copping, L. G., eds. *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 299-316.

Stankievicz, P. J., Gresser, M. J., Tracey A. S., Hass, L. F. 1987. 2, 3 – diphosphoglycerate phosphatase activity of phosphoglycerate mutase: Stimulation by vanadate and phosphate. *Biochemistry*. 26: 1264 – 1269.

Stern, A., Yin, X., Tsang, S. S., Davison. A., Moon, T. 1993. Vanadium as a modulator of cellular regulatory cascades and oncogene expression. *Biochem. Cell. Biol.* 71: 103 – 112.

Sujith, A., Itoh, T., Abe, H., Yoshida, K – i., Kiran, M. S., Biju, V., Ishikawa, M. 2009. Imaging the cell wall of living single yeast cell using surface – enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 394: 1803 – 1809.

Sutter, R. P., 1975. Mutations affecting sexual development in *Phycomyces blakesleeanus*. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 127 - 130.

Terry, M. J., Williams, M. E. (2002). Fractionation of plant tissue for biochemical analyses. In: Gilmartin, P., Bowler, C., eds. 2002. *Molecular plant biology, Vol 2: A practical approach*. Oxford: Oxford University Press, pp. 147 – 171.

Tolbert, N. E. 1974. Isolation of subcellular organelles of metabolism on isopicnic sucrose gradients. *Meth. Enzymol.* 31: 734 – 746.

Tolman, E. L., Barris, E., Burns, M., Pansini, A., Partridge, R. 1979. Effects of Vanadium on Glucose Metabolism *in vitro*. *Life. Sci.* 25: 1159 – 1164.

Tsave, O., Petanidis, S., Kieseoglou, E., Yavropoulou, M. P., Yovos, J. G., Anastakis, D., Tsepa, A., Salifloglou, A. 2016. Role of Vanadium in Cellular and Molecular Immunology: Association with Immune – Related Inflammation and Pharmacotoxicology Mechanisms. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4013639>.

Tsiani, E. and Fantus, I. G. 1997. Vanadium Compounds Biological Actions and Potential as Pharmacological Agents. *Trends Endocrinol. Metab.* 8: 51 – 58.

Van Schijndel, J. W. P. M., Vollenbroek, E. G. M., Wever, R. 1993. The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1161: 249 – 256.

Versaw, W. K. and Metzenberg, R. L. 1995. Repressible cation - phosphate symporters in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 3884-3887.

Vilter, H. 1984. Peroxidases from phaeophyceae: A vanadium(V) – dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry.* 23 (7): 1387 – 1390.

Vilter, H., Globitza, K. W., Grawe, A. 1983., Peroxidases from Phaeophyceae: Extraction and Detection of the Peroxidases. *Bot. Mar.* 26: 331 – 340.

Wakatsuki, T., Hayakawa, S., Hatayama, T., Kitamura, T., Imahara, H. 1991a. Solubilization and properties of copper reducing enzyme systems from the yeast cell surface in *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 79 – 86.

Wakatsuki, T., Hayakawa, S., Hatayama, T., Kitamura, T., Imahara, H. 1991b. Purification and some properties of copper reductase from cell surface of *Debaryomyces hansenii*. *J. Ferment. Bioeng.* 72: 158–161.

Webster, J. and Weber, R. W. S. (2007). *Introduction to fungi.* 3rd. ed. Cambridge: Cambridge University Press.

- Willsky, G. R., Chi, L-H., Godzala III, M., Kostyniak, P. J., Smee, J. J., Trujillo, A. M., Alfano, J. A., Ding, W., Hu, Z., Crans, D. C. 2011. Anti – diabetic effect of a series of vanadium dipicolinate complexes in rats with streptozotocin – induced diabetes. *Coord. Chem. Rev.* 255: 2258 – 2269.
- Willsky, G. R., Goldfine, A. B., Kostyniak, P. J., McNeill, J. H., Yang, L. Q., Khan, C. R., Crans, D. C. 2001. Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: *in vivo* and *in vitro* studies with vanadil sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). *J. Inorg. Biochem.* 85: 33 – 42.
- Willsky, G. R., White, D. A., McCabe, B. C. 1984. Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high – molecular weight vanadates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259: 13273 – 13281.
- Yamamoto, S., Matsuo, K., Michibata, T., Ueki, T. 2014. Role of cysteine residues in the V(V) – reductase activity of Vanabin2. *Inorg. Chim. Acta.* 420: 47 – 52.
- Yannai, S., Berdichevsky, I., Duek, L. 1991. Transformations of inorganic mercury by *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 245–247.
- Zeltzer, S. 1932. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part XXV. An investigation of solutions of gallium, titanium, vanadium, niobium and tantalum. *Collect. Chem. Czech. Commun.* 4: 319 – 334.
- Zhang, J., Dong, H., Zhao, L., McCarrick, R., Agrawal, A. 2014. Microbial reduction and precipitation of vanadium by mesophilic and thermophilic methanogens. *Chem. Geol.* 370: 29 – 39.
- Zhang, K., Geissler, A., Fischer, S., Brendler, E., Bäucker, E. 2012. Solid – state spectroscopic characterization of α – chitins deacetylated in homogenous solutions. *J. Phys. Chem. B.* 116: 4584 – 4592.
- Zoroddu, M. A., Masia, A. 1997. A novel dimeric oxovanadium(IV) species identified in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1538: 249 – 254.

Zoroddu, M. A., Fruianu, M., Dallochio, R., Masia, A. 1996. Electron paramagnetic resonances studies and effects of vanadium in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioMetals*. 9: 91-97.

Živić, M. (2005). *Identifikacija jonskih kanala i uloga polifosfata u rastenju kod gljive *Phycomyces blakesleanus**. Doktorska disertacija: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet.

Žižić, M., Dučić, T., Grolimund, D., Bajuk – Bogdanović, D., Nikolic, M., Stanić, M., Križak, S., Zakrzewska, J. 2015. X – ray absorption near – edge structure micro – spectroscopy study on vanadium speciation in *Phycomyces blakesleanus* mycelium. *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (24): 7487 – 7496.

Žižić, M., Živić, M., Maksimović, V., Stanić, M., Križak, S., Cvetić Antić, T., Zakrzewska, J. 2014. Vanadate influence on metabolism of sugar phosphates in fungus *Phycomyces blakesleanus*. *PLOS ONE*. 9 (7): 102849 – 102855.

Žižić, M. (2013). *Metabolizam i metabolički efekti vanadijuma kod gljive *Phycomyces blakesleanus**. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu.

Žižić, M., Živić, M., Spasojević, I., Bogdanović Pristov, J., Stanić, M., Cvetić Antić, T., Zakrzewska, J. 2013. The interactions of vanadium with *Phycomyces blakesleanus* mycelium: enzymatic reduction, transport and metabolic effects. *Res. Microbiol.* 164: 61 – 69.

BIOGRAFIJA

Mirzeta Hadžibrahimović rođena je 23. 05. 1975. u Novoj Varoši, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet u Beogradu je upisala 1994., završila 2006., sa prosečnom ocenom 8.89.

Od maja 2007. do maja 2008. god. radila je kao pripravnik volonter u Specijalnom rezervatu prirode „Uvac“ u Novoj Varoši. Od septembra 2008. do septembra 2010. radila je kao saradnik u nastavi na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru, a zatim do septembra 2016. kao asistent na istom univerzitetu.

Doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu upisala je novembra 2010. god. Osnovna oblast naučno istraživačkog delovanja tiče joj se usvajanja, redukcije i specijacije vanadijuma od strane gljive *Phycomyces blakesleeanus*, primenom elektrohemijske oksidoredukcione metode polarografije i spektroskopskih metoda NMR i EPR. Bavi se i radioekologijom, primenom gama – spektrometrije.

U koautorstvu je objavila četiri naučna rada u međunarodnim časopisima, jedan u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja i devet saopštenja na domaćim i internacionalnim naučnim skupovima. Član je Biofizičkog društva Srbije i Društva za zaštitu od zračenja Srbije i Crne i Gore. Dobro se služi engleskim jezikom, govornim i pisanim.

BIBLIOGRAFIJA

RADOVI OBJAVLJENI U ČASOPISIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA (M20)

Radovi objavljeni u istaknutim međunarodnim časopisima (M22)

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.

Stanić, M., Zakrzewska, J., **Hadžibrahimović, M.**, Žižić, M., Marković, Z., Vučinić, Ž., Živić, M. 2013. Oxygen regulation of alternative respiration in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: connection with phosphate metabolism. *Res Microbiol.* 164(7): 770-778.

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M23)

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.

Stanić, M., Živić, M., **Hadžibrahimović, M.**, Pajdić, A., Križak, S., Žižić, M., Zakrzewska, J. 2014. Effect of long – term cyanide exposure on cyanide – sensitive respiration and phosphate metabolism in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Arch. Biol. Sci.* 66(2): 847 – 857.

Radovi objavljeni u nacionalnim časopisima međunarodnog značaja (M24)

Antović, I., Svrkota, N., Stojanović, D., **Hadžibrahimović, M.**, Žižić, R. Laštovička – Medin, G. 2016. Soil and vegetation from Novi Pazar (Serbia) and Rožaje (Montenegro): Radioactivity impact assessment. *Radiation and Application.* 1(2): 105 – 110.

KONGRESNA SAOPŠTENJA NA SKUPOVIMA MEĐUNARODNOG ZNAČAJA (M30)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

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.

I. Antović, N. Svrkota, D. Stojanović, **M. Hadžibrahimović**, R. Žižić, G. Laštovička – Medin: „Soil and vegetation from Novi Pazar (Serbia) and Rožaje (Montenegro): Radioactivity impact assessment“, Third International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research, Faculty of Electronic Engineering, 08 – 12 June 2015, Budva, Montenegro.

I. Antović, N. Svrkota, **M. Hadžibrahimović**, R. Žižić: „Radioecological research on three species of the genera *Liza* from South Adriatic Sea“, Second International Conference on Radiation and Dosimetry in Various Fields of Research, Faculty of Electronic Engineering, 27 – 30 May 2014, Niš, Serbia.

Stanić M, **Hadžibrahimović M**, Žižić M, Zakrzewska J, Živić M. Metabolism of phosphate compounds during oxygen deprivation in fungus *Phycomyces blakesleeanus*: possible connection with changes in respiration. Regional Biophysical conference, 03-07 September 2012, Kladovo, Serbia.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

Antović, I., Svrkota, N., **Hadžibrahimović, M.**, Antović, N. M., Žižić R. First determination of Be – 7 in fish from the South Adriatic: *Liza species* (*L. aurata*, *L. ramada*, *L. saliens*). ENVIRA 2015, International Conference Environmental Radioactivity, 21 – 25 September 2015, Thessalonike, Greece.

Mirčić, D., **Hadžibrahimović, M.**, Stojanović, D., Radulović, B., Dolovac, A., Eminović, I., Psychology and biology students` perception on relationships amongst evolutionary biology, religion and "scientific" creationism. IV naučno-stručna konferencija "Unapređenje kvalitete života djece i mladih", 22 - 23 June, 2013, Split, Croatia.

Stanić M., Živić M., **Hadžibrahimović M.**, Žižić M. Zakrzewska J. Anoxia induces increased activity of alternative oxidase in fungus *Phycomyces blakesleeanus*. 8th European Biophysics Conference, 23 - 27 August 2011, Budapest, Hungary.

KONGRESNA SAOPŠTENJA NA SKUPOVIMA NACIONALNOG ZNAČAJA (M60)

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u celini (M63)

Ivanka Antović, **Mirzeta Hadžibrahimović**, Gordana Laštovička-Medin: "Da li se efekti usled zračenja prirodnih radioizotopa i cezijuma-137 kod dve vrste riba iz južnog Jadranskog mora (*Mugil cephalus* Linnaeus, 1758 i *Liza saliens* Risso, 1810) mogu očekivati?", XXVII simpozijum Društva za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore, Vrnjačka Banja - Srbija, 02.10-04.10. 2013.

Ivanka Antović, Dalibor Stojanović, Nikola Svrkota, Ranka Žižić, **Mirzeta Hadžibrahimović**: "Početna radioekološka istraživanja u Novom Pazaru - područje Novopazarska Banja", XXVII simpozijum Društva za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore, Vrnjačka Banja - Srbija, 02.10 - 04.10. 2013.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Мирзета Р. Хаџибрахимовић

Број индекса Б3006/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Редукција ванадата у мицелијуму гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff:

одређивање оксидационих стања у ћелији

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 31. 01. 2017.

Мирзета Хаџибрахимовић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирзета Хаџибрахимовић

Број индекса Б 3006/2010

Студијски програм Биологија

Наслов рада Редукција ванадата у мицелијуму гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff: одређивање оксидационих стања у ћелији

Ментори др Живић Мирослав, ванредни професор, Биолошки факултет,

Универзитет у Београду

др Жижич Милан, научни саветник, Институт за
мултудисциплинарна истраживања,

Универзитет у Београду

Потписана Хаџибрахимовић Мирзета

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 31. 01. 2017.

Мирзета Хаџибрахимовић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Редукција ванадата у мицелијуму гљиве *Phycomyces blakesleeanus* Бургеф: одређивање оксидационих стања у ћелији

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 31. 01. 2017.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.