

АКАДЕМСКЕ
БЕСЕДЕ

БЕОГРАД • 2019





АКАДЕМСКЕ БЕСЕДЕ

Књига II

ISSN 2466-5134

SERBIAN ACADEMY OF SCIENCES AND ARTS

PRESIDENCY

ACADEMIC SPEECHES

Volume 2

The volume is published on account of the SASA
Presidency resolution adopted at its 1st session of 28
February 2019 and the SASA Executive Board resolution
adopted at its 18th session of 19 September 2019

Editor

academician
MIRO VUKSANOVIĆ

BELGRADE
2019

СРПСКА АКАДЕМИЈА НАУКА И УМЕТНОСТИ

ПРЕДСЕДНИШТВО

АКАДЕМСКЕ БЕСЕДЕ

Књига 2

Књига је објављена на основу одлуке Председништва
САНУ са I седнице 28. фебруара 2019. и одлуке
Извршног одбора САНУ са XVIII седнице
19. септембра 2019. године

Уредник

академик
МИРО ВУКСАНОВИЋ

БЕОГРАД
2019

SASA PRESIDENCY

academician Vladimir S. Kostić,
President of SASA

academician Zoran V. Popović,
Vice President of SASA for Natural Sciences

academician Ljubomir Maksimović,
Vice President of SASA for Social Sciences

academician Marko Anđelković,
Secretary General of SASA

academician Stevan Pilipović,
President of SASA Branch in Novi SAD

academician Ninoslav Stojadinović,
President of SASA Branch in Niš

academician Gradimir Milovanović,
*Secretary of the Department of Mathematics,
Physics and Geo Sciences*

academician Vladimir Stevanović,
*Secretary of the Department of Chemical
and Biological Sciences*

academician Zoran Lj. Petrović,
Secretary of the Department of Technical Sciences

academician Dragan Micić,
Secretary of the Department of Medical Sciences

academician Zlata Bojović,
Secretary of the Department of Language and Literature

academician Kosta Čavoški,
Secretary of the Department of Social Sciences

academician Mihailo Vojvodić,
Secretary of the Department of Historical Sciences

academician Milan Lojanica,
Secretary of the Department of Fine Arts and Music

ПРЕДСЕДНИШТВО САНУ

академик Владимир С. Костић,
п̄редседник САНУ

академик Зоран В. Поповић,
п̄ошп̄редседник САНУ за п̄риродне науке

академик Љубомир Максимовић,
п̄ошп̄редседник САНУ за друшп̄вене науке

академик Марко Анђелковић,
п̄енерални секретар САНУ

академик Стеван Пилиповић,
п̄редседник Опранка САНУ у Новом Саду

академик Нинослав Стојадиновић,
п̄редседник Опранка САНУ у Нишу

академик Градимир Миловановић,
*секретар Одељења за мап̄емап̄ику,
физику и п̄ео-науке*

академик Владимир Стевановић,
*секретар Одељења хемијских
и биолошких наука*

академик Зоран Љ. Петровић
секретар Одељења п̄техничких наука

академик Драган Мицић,
секретар Одељења медицинских наука

академик Злата Бојовић,
секретар Одељења језика и књижевности

академик Коста Чавошки,
секретар Одељења друшп̄вених наука

академик Михаило Војводић,
секретар Одељења историјских наука

академик Милан Лојаница,
секретар Одељења ликовне и музичке уметности

Ликовни прилози

Петар Лубарда
Наука, слика, Свечана сала САНУ
(на предњим корицама)

Мило Милуновић
Умејносћ, слика, Свечана сала САНУ
(на задњим корицама)

Ђорђе Јовановић
Наука и умејносћ, скулптура, улазни хол у САНУ
(на почетку књиге)

Младен Србиновић
Детаљи *Вишража*, Свечана сала САНУ
(на белинама у књизи)

САДРЖАЈ

Академик Миро Вуксановић <i>Три књије чланова САНУ.....</i>	15
Приступне беседе садашњих редовних чланова САНУ	25
Одељење за математику, физику и гео-науке	
Академик Зоран Радовић <i>О сујерјироводности и мајнејизму.....</i>	47
Академик Милан Судар <i>Конодонџи, фосили значајни за сајледавање и џумачење геолошке џрошлости.....</i>	49
Академик Миодраг Мателјевић <i>Неки асјектџи теорје џојенцијала, визуализација, варијациони рачун и џримене</i>	73
Одељење хемијских и биолошких наука	
Академик Слободан Милосављевић <i>Фџиохемијски џуџојис</i>	113
Академик Радмила Петановић <i>Инџејрајџивна џаксономија – нови џрисиџуј или нова кованица? Дометџи у џаксономији Eriophyoidea (Arthropoda, Acari, Acariformes)</i>	139
Академик Радомир Н. Саичић <i>Тојјална синџеза џриродних џроизвода и развој синџејџичке мейодолојје: неколико џримера из наше лабораторје</i>	159

Одељење техничких наука

- Академик Милош Којић
Компјутерски модели у техници и медицини 183

Одељење медицинских наука

- Академик Зоран Кривокапић
Да ли је срећа пресудна за успех? 205
- Академик Милорад Митковић
*Динамичка фиксација у ортопедској
хирургији – од идеје до исцељења* 221
- Академик Петар Сеферовић
*Масовна, смртоносна, излечива: савремена
терапија срчане слабости* 245

Одељење језика и књижевности

- Академик Горан Петровић
Пајир 275
- Академик Злата Бојовић
Самосвојности дубровачке књижевности 283
- Академик Милован Данојлић
За толеранцију 295

Одељење друштвених наука

- Академик Александар Костић
Коинтивна обрада језика и веровајноћа 305

Одељење историјских наука

- Академик Љубодраг Димић
Југославија и Совјетски Савез 1968. године 325

Одељење ликовне и музичке уметности

- Академик Милица Стевановић
*О инсајдерској перформанси – похвала
фигурацији* 347

Радне биографије беседника

- Зоран Радовић 371

Милан Судар	375
Миодраг Матељевић	381
Слободан Милосављевић	385
Радмила Петановић	389
Радомир Н. Саичић	395
Милош Којић	399
Зоран Кривокапић	403
Милорад Митковић	407
Петар Сеферовић	413
Горан Петровић	419
Злата Бојовић	423
Милован Данојлић	427
Александар Костић	431
Љубодраг Димић	435
Милица Стевановић	441





Свечани скуп

ПРИСТУПНЕ БЕСЕДЕ
НОВОИЗАБРАНИХ РЕДОВНИХ ЧЛАНОВА
СРПСКЕ АКАДЕМИЈЕ НАУКА И УМЕТНОСТИ

13–15. мај 2019.

ОДЕЉЕЊЕ ХЕМИЈСКИХ
И БИОЛОШКИХ НАУКА







Слободан Милосављевић

Фиџохемијски њуџојис

1. Увод

Фитохемија се бави изучавањем *секундарних метаболита* који настају у биљкама. То су молекули релативно малих молекулских тежина (мањих од 1000 Daltona) и врло разноврсних структура. Ови природни производи имају примарно еколошке функције. Биљке синтетишу ова једињења из много разлога, укључујући сопствену заштиту од напада биљоједа и од биљних болести. Мирис биљке потиче од испарљивих етарских уља која садрже секундарне метаболите – атрактанте – који привлаче инсекте опрашиваче. Многе биљке луче хемијска једињења која инхибиторно или стимулативно делују на друге биљке. Ова појава се означава као *алелопатија*. Међусобни односи између биљних врста успостављају се путем специфичних хемијских супстанци које биљке синтетизују и излучују у околину. Сматра се да су секундарни метаболити представљали адаптацију биљне врсте на различите еколошке факторе и да су управо они омогућили опстанак врста. Секундарни метаболити биљака могу испољити лековито и токсично дејство код људи и животиња. Лечење биљем има дугу традицију у народној медицини и све до почетка 20. века, када је почела да се развија синтетичка органска хемија, биљке су биле главни извор лекова. На основу података Светске здравствене организације, лековитим биљем се и данас лечи око 80% становништва Азије и Африке.

Фитохемија је мултидисциплинарна област која обухвата *ботанику* и *хемију*. Активности се могу спроводити у ботаничким баштама или у дивљини, најчешће уз помоћ *етноботанике*. Ова дисциплина налази примену у *фармакогнозији* (откривању нових лекова), студијама биљне физиологије, медицине, токсикологији, таксономији, ентомологији...

У овом тексту дат је сажет преглед фитохемијских испитивања дивљерастуће (спонтане) флоре Србије и Црне Горе у периоду од пола века (почевши од краја 1960-их година) у Лабораторији за инструменталну анализу (Хемијски факултет и Центар за хемију/Институт за хемију, технологију и металургију, Универзитет у Београду). Ова делатност илустрована је кроз пример фитохемијског испитивања рода *Amporicarpus* – ендемита западног Балкана.

2. Аналитичке технике које се примењују за фитохемијску анализу

У другој половини XX века *сјектроскопија* је, заједно са *хроматографијом* (техника раздвајања органских једињења) постала камен темељац органске хемије, па самим тим и фитохемије. Најважније спектроскопске и хроматографске методе које се данас рутински користе јесу *ултраљубичаста-видљива сјектроскопија* (UV-Vis: Ultra Violet-Visible), *инфрацрвена сјектроскопија* (IR: Infra Red), *масена сјектроскопија* (MS: Mass Spectrometry), *нуклеарно-магнетна резонантна сјектроскопија* (NMR: Nuclear Magnetic Resonance), *гасна хроматографија* (GC: Gas Chromatography) и *течна хроматографија* (LC: Liquid Chromatography или HPLC: High Performance Liquid Chromatography), а у новије време за раздвајање поларних једињења све више се користи и *капиларна електрофореза* (CE: Capillary Electrophoresis). Посебно место међу методама анализе сложених смеша заузимају тзв. *повезане инструменталне технике* (енгл. *hyphenated instrumental techniques*), које обухватају директно повезивање спектрометара са хроматографима. Највише коришћене повезане технике свакако су (GC/MS, LC/UV, LC/MS, LC/NMR, LC/MS/NMR, CE/MS). Предност повезаних техника је што омогућавају директну идентификацију једињења без претходног препаративног раздвајања, чиме се скраћује време анализе и значајно смањује потребна количина почетног биљног материјала – до реда величине стотинак милиграма. Оне се обично користе за прелиминарне анализе екстраката, а ако се након тога покаже да биљни материјал садржи интересантне састојке, предузима се препаративно одвајање помоћу хроматографских метода (најчешће стубна

хроматографија, препаративна танкослојна хроматографија или препаративна течна хроматографија). У циљу проналажења нових лекова, фитохемија се комбинује са (*in vitro*) тестовима биолошких активности.

3. Фитохемија код нас

За почетак фитохемије код нас значајна је 1966. година када је на Хемијском институту Природно-математичког факултета у Београду (данашњем Хемијском факултету) и Одељењу за органску синтезу (данас Центар за хемију) Института за хемију, технологију и металургију (ИХТМ) основана *Лабораторија за инструменталну анализу*. Први управник Лабораторије био је др Драгослав Јеремић, а на челу Одељења за органску синтезу је био професор Милутин Стефановић. На самом почетку Лабораторија је опремљена најмодернијим аналитичким инструментима, као што су ^1H NMR, UV/Vis и IR спектрометри и гасни хроматографи. Такви инструменти су у то време постојали само у најопремљенијим светским лабораторијама. Опремање Лабораторије завршено је крајем 1969. набавком моћног масеног спектрометра (MS), чиме је створен модеран Центар за инструменталну анализу (ЦИА), познат и данас по том имену. Пуштање у рад ове нове капиталне опреме и њена широка употреба (опрема је била доступна свим заинтересованим на простору бивше Југославије) значајно су подигли општи ниво хемије код нас. Омогућено је и увођење бројних нових области истраживања, међу којима је била и *фитохемија*. Фитохемијска истраживања код нас су увели професори Милутин Стефановић и Драгослав Јеремић (Слика 1).



Милутин Стефановић 1924–2009

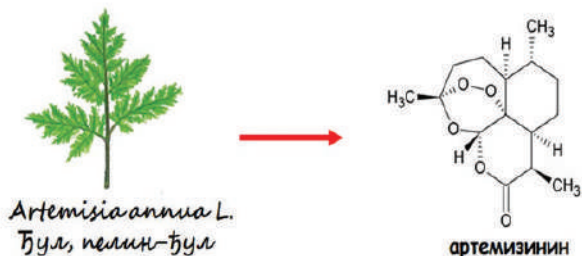


Драгослав Јеремић 1929–2011

Слика 1. Зачетници фитохемијских истраживања код нас.

Уз помоћ сарадника Ботаничке баште „Јевремовац“ из Београда Животе Јоксимовића, прикупљање биљног материјала, припрему екстракта и изоловање чистих једињења радила је група М. Стефановића, а снимање спектра и идентификација изолованих једињења рађена је под руководством Д. Јеремића у Лабораторији за инструменталну анализу. Истраживања су започета хемијском анализом самониклих биљака рода *Artemisia* из велике фамилије Compositae (Asteraceae), да би касније била проширена и на другу велику фамилију Apiaceae (Umbelliferae).

Група проф. Стефановића која је, паралелно са фитохемијом, наставила да се бави и хемијским модификацијама стероида, била је ангажована у фитохемијским истраживањима све до почетка 1990-их година. Преглед тих резултата приказан је у ревијалном раду [14]. Потребно је нагласити да је свакако најзначајнији резултат тих истраживања изоловање моћног антималярика артемизинина на самом почетку (1970) из CHCl_3 -екстракта надземних делова биљне врсте *Artemisia annua*, и то две године пре него што је ово једињење изоловано у Кини [18] (Слика 2).



Слика 2. Из надземних делова *Artemisia annua* изолован је крајем 1970. године у лабораторији М. Стефановића нови антималярик артемизинин [18].

Нажалост, Стефановић и Јеремић нису ово публиковали, а кинеска научница Ту Јују је за то откриће добила Нобелову награду 2015. године (Слика 3).

После повлачења професора Стефановића и Јеремића, почетком 1990-их, наша група (ЦИА) потпуно преузима фитохемијска истраживања и остварује сарадњу са многобројним



Слика 3. Кинеска научница Ту Јују, добитница Нобелове награде за физиологију или медицину 2015. године за откриће антималярике артемизинина.

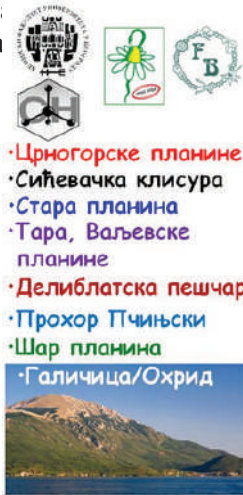
различитим институцијама. Доминантно место у оквиру ове сарадње заузимају Институт за проучавање лековитог биља „Др Јосиф Панчић“ у Београду (у даљем тексту ИПЛБ), Ботаничка башта „Јевремовац“ (Биолошки факултет, Универзитет у Београду) и Клиника Мејо (Мајо) (Рочестер, Минесота), где су под руководством др Слободана Мацуре снимани NMR спектри наших узорака у време када то код нас није било могуће (од краја 1980-их до почетка 2000-их).

3.1. Порекло испитиваних биљака – фармакогнозијске екскурзије

Посебно су значајне екскурзије које од оснивања ИПЛБ организују сарадници тог института у оквиру систематског фармакогнозијског проучавања планинске флоре Србије и Црне Горе, а у којима (од 90-их година) учествују и сарадници Хемијског факултета и Центра за хемију/ИХТМ (Слике 4–7).

Најважнији локалитети који су том приликом посећени и детаљно ботанички и фитохемијски обрађени су: северни део Шар-планине (Косово), Стара планина, Тара, Прохор Пчињски, Сићевачка клисура, Делиблатска пешчара у Србији, Проклетије, Виситор, Зелетин, Комови, Бјеласица, Сињајевина, Дурмитор, Жабљак, кањони Драге и Таре, Ловћен и Орјен у Црној Гори. Последњих година

истр
у Ма



чица

Слика 4. Локалитети на којима су прикупљане испитиване биљне врсте.



Слика 5. Снимак са фармакогнозијске екскурзије у организацији ИПБ „Др Јосиф Панчић“ лета 2002. године на Проклетијама, локалитет Котлови (Фото: Тасић); први слева стоји организатор екскурзије др Небојша Менковић (ИПБ „Др Јосиф Панчић“); водичи: четврти слева стоји Данијел Винцек („Ботаничка башта планинске флоре Црне Горе“, Дуловине, Колашин), пети слева стоји Милутин-Мићо Прашчевић (Ботаничка башта „Велемун“, Брезојевице, Плав).



Слика 6. Сушење биља, на Орјену (Врбањ), снимљено 2006. године.



Слика 7. Планина Хајла изнад Рожаја, снимљено јула 1998. године.

У оквиру поменутих фармакогнозијских истраживања у организацији ИПЛБ „Др Јосиф Панчић“, у последње две деценије у Србији (са Шаром) пописано је приближно 1.100

биљних врста, од којих је у фармако-еколошки-економском смислу могућа експлоатација њих стотинак. Од 850 до 900 биљних врста, колико је регистровано у Црној Гори, за експлоатацију према поменутиим критеријумима одговара око 50-ак врста.

До почетка 2000-их наша фитохемијска испитивања су била ограничена углавном на фамилију Asteraceae (Compositae) и нешто мање на фамилију Apiaceae (Umbelliferae), и то на липофилне (неполарне) секундарне метаболите (сесквитерпенски лактони и флавоноиди) да би потом била проширена и на више других фамилија.

Следи списак биљних фамилија и родова које су хемијски испитиване од 70-их година прошлог века на данашњем Хемијском факултету, Центру за хемију/ИХТМ и ИПЛБ „Др Јосиф Панчић“ (број испитаних врста дат је у загради):

Compositae (Asteraceae)

Artemisia L. (9), *Ambrosia* L. (1), *Tanacetum* L. (5), *Telesia Baumg.* (19), *Eupatorium* L. (1), *Achillea* L. (10), *Centaurea* L. (15), *Anthemis* L. (6), *Amphoricarpos* Vis. (2), *Senecio* L. (7), *Helichrysum* Mill. (2), *Cicerbita* Wallr. (2), *Ptilostemon* Cass. (2)

Apiaceae (Umbelliferae)

Laserpitium L. (4), *Peucedanum* L. (1), *Angelica* L. (1), *Seseli* L. (2), *Chaerophyllum* L. (1), *Athamanta* L. (1), *Mallabaila* Hoffm. (1)

Hypericaceae

Hypericum L. (9)

Gentianaceae

Swertia L. (2), *Gentianella* Moench. (5), *Gentiana* L. (9)

Dipsacaceae

Cephalaria Schrad. (3)

Lamiaceae

Phlomis L. (1), *Satureja* L. (2), *Lycopus* L. (1), *Sideritis* L. (2)

Euphorbiaceae

Euphorbia L. (2)

Fabaceae

Trifolium L. (2), *Onobrychis* Mill. (1)

Anacardiaceae

Cotinus Adans. (1)

Boraginaceae

Rindera Pall. (1)

Betulaceae*Alnus* Hill. (2)**Pinaceae¹***Pinus* L. (3), *Picea* A. Dietr. (1), *Pseudotsuga* Carrière (1)

Од 1970. године до сада у нашим лабораторијама хемијски су испитане укупно 124 врсте, а од њих је 97 (≈78%) описано у Панчићевим флористичким публикацијама (ФКС, ДФКС, ЕРVСG) (Слика 8). У новије време наша фитохемијска истраживања су проширена и на секундарне метаболите неких гљива и јетрењача (маховина).



Слика 8. Флористичке публикације Јосифа Панчића: *Флора Кнежевине Србије* (ФКС) и *Elenchus Plantarum Vascularium Crna Gora* 1875 (ЕРVСG) (*Додатак Флори Кнежевине Србије* (ДФКС) који се помиње у тексту, није приказан).

3.2. Секундарни метаболити изоловани у оквиру наших фитохемијских испитивања (од 1970. до данас)

Изоловано је и помоћу спектра окарактерисано неколико стотина једињења, припадника више класа природних

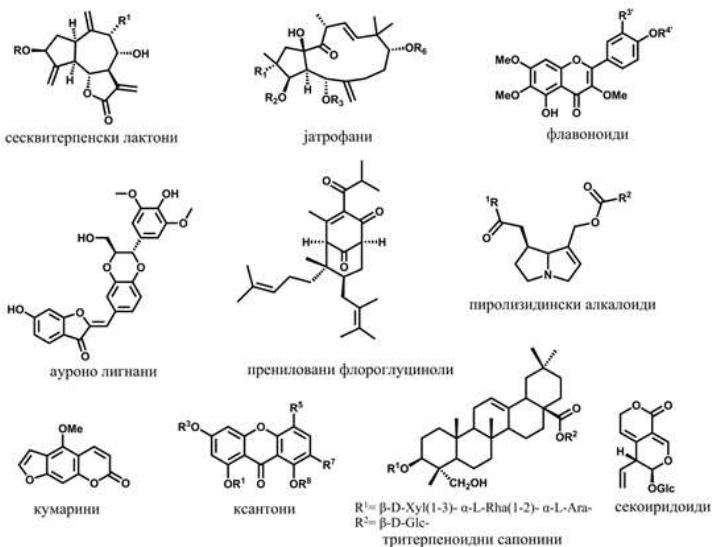
¹ Хемотаксономски радови под руководством проф. Петра Марина (Биолошки факултет Универзитета у Београду)

производа, међу којима су сесквитерпенски лактони, флавоноиди, кумарини, пиролизидински алкалоиди, јатрофани (дитерпени), ксантони, секоиридоиди, прениловани флороглуциноли, тритерпеноидни сапонини, диарилхептаноиди итд. (Слика 9). Велики број тих једињења били су нови природни производи, а многа од њих су показала (*in vitro*) различите биолошке активности (антибактеријске, антифунгалне, цитотоксичне, тубулински тест, антиоксидативне, радиопротективне итд.). Преглед највећег дела резултата наших испитивања до 2010. год. приказан је у четири ревијална рада [14, 1, 15, 17].

Основни циљеви наших фитохемијских истраживања обухватају следеће:

- (1) Изоловање и идентификација нових (биолошки активних) једињења – потенцијалних лекова;
- (2) Хемотаксономија (хемосистематика).

У даљем тексту кроз један одабран пример – род *Amphoricarpus* Vis. – приказана су оба наведена аспекта ових фитохемијских истраживања.



Слика 9. Представници појединих класа секундарних метаболита изолованих из биљака испитиваних у нашим лабораторијама од почетка 1970-их.

4. Фитохемијско испитивање рода *Amphoricarpus* Vis. (Compositae)



Слика 10. *Amphoricarpus neumayeri* Vis. (Asteraceae), крчаговина, са Орјена.

Високопланински род *Amphoricarpus* (Слика 10), ендемит западног Балкана, насељава пукотине кречњачких стена од централне Босне до северозападне Грчке [3, 19]. Таксономски статус рода још није у потпуности дефинисан. Блечић и Мајер су предложили две врсте, *A. neumayeri* Vis. и *A. autariatus* [3], при чему се *A. autariatus* дели на две подврсте, ssp. *autariatus* и ssp. *bertisceus* Blečić et Mayer. Док је станиште *A. neumayeri* ограничено на приобалне планине око Бокоторског залива, Орјен и Ловћен, ssp. *autariatus* насељава знатно ширу област: планине централне Босне, Херцеговине и северозападне Црне Горе, а ssp. *bertisceus* се може наћи на Проклетијама (Косову, Албанији и Црној Гори), Сињајевини, Виситору, Зелетину, Комовима и планинама северне Грчке (Слика 11А).

За време боравка у Црној Гори (1873) Панчић налази род *Amphoricarpus* у стеновитим пределима планина Ловћен, Велика Јастребица, изнад Грахова, на планини Дурмитор

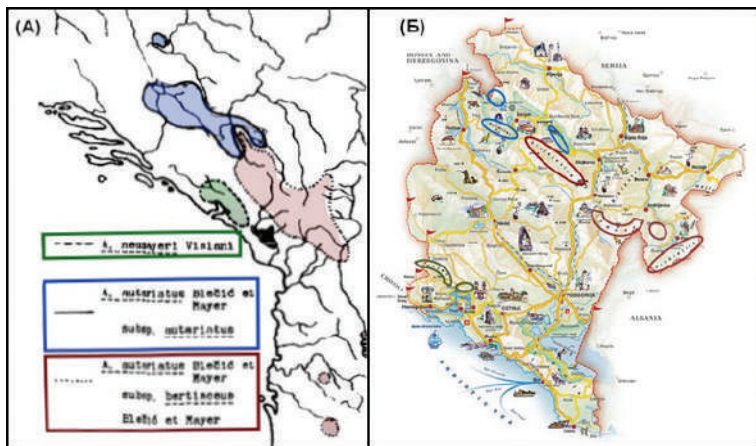


Abb. 9. Areale der europäischen *Amphoricarpos*-Sippen auf der Balkanhalbinsel.

Слика 11. (А) Планине западног Балкана које насељава род *Amphoricarpos* (Blečić & Mayer, 1967); (Б) Локације на којима су прикупљани узорци рода за наша фитохемијска испитивања.

према Црвеној стијени и на планини Ком код Високе греде и наводи га под именом *A. neumayeri* Vis (EPVCG: 54). С друге стране, D. A. Webb (1972) [19] признаје само једну врсту, *A. neumayeri* Vis. која се дели на подврсте, ssp. *neumayeri* и ssp. *murbeckii* Vošnjak (syn. *Amphoricarpos autariatus* [3]). Пре четири године на основу студије генома овог рода предложена је само једна балканска врста, *A. neumayerianus* (Vis.) Greuter [4]. У свету постоје још три врсте рода: *A. exsul* Schwartz и *A. praedictus* Ayasligil & Grierson (планински ланац Таурус, југозападна Анадолија, Турска) [11] и *A. elegans* Albov (западни Кавказ, Грузија) [16].

4.1. Секундарни метаболити рода *Amphoricarpos*

Систематско испитивање секундарних метаболита надземних делова рода *Amphoricarpos* започето је 2001. године као предмет докторске дисертације на Хемијском факултету [8] да би касније било настављено и у оквиру магистарске тезе [12]. Узорци сва три таксона (према Блечићу и Мајеру) прикупљани су на разним локалитетима широм Црне Горе (Слика 11Б).

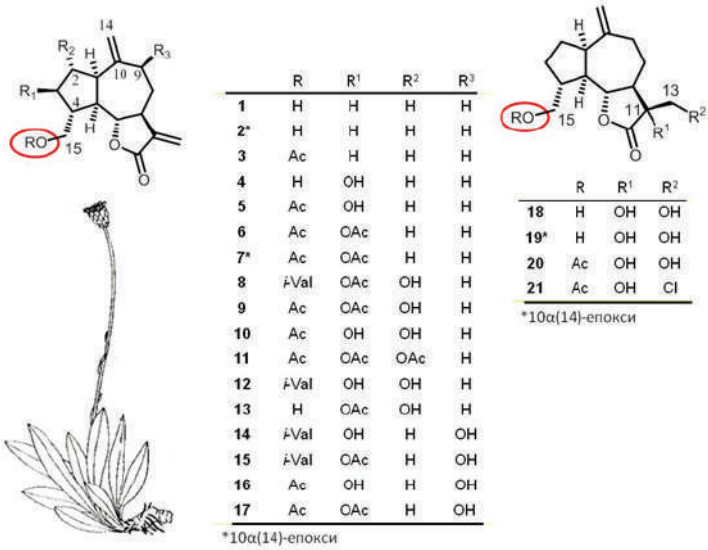


Слика 12. Поглед на масив Каранфила (Проклетије) на коме се налази станиште *A. autaritus* ssp. *bertisceus* (означено кругом).

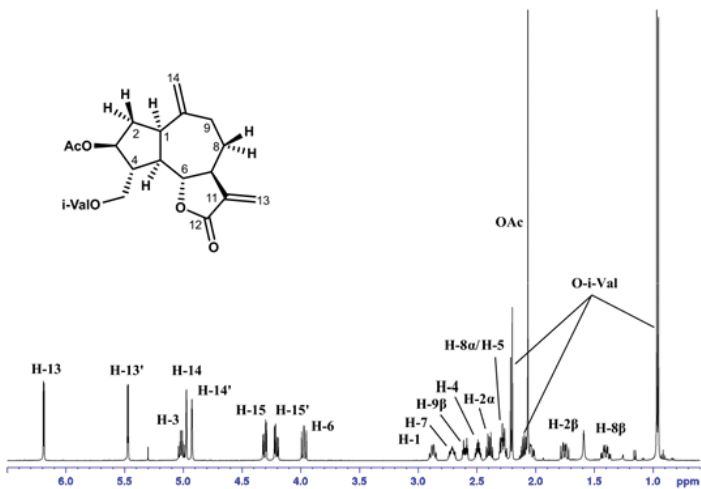


Слика 13. Прикупљање узорака *A. autaritus* ssp. *bertisceus* на Каранфилима.

Комбинацијом различитих препаративних хроматографских метода до сада су изолована укупно 34 сесквитерпенска



Слика 14. Примери гвајанолида (амфорикарполида) секундарних метаболита рода *Amphoricarpos*.

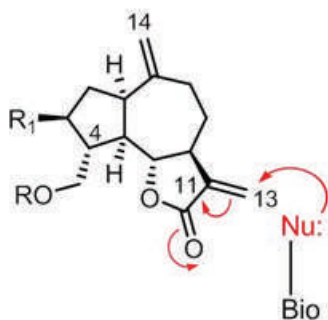


Слика 15. ¹H (500) MHz NMR спектар 15-O-изовалероил-3-O-ацетил-амфорикарполида.

лактона гвајанолидног типа (Слика 14), који су названи *амфорикарполиди* [7, 9, 5].

Типичан ^1H NMR спектар једног амфорикарполида приказан је на Слици 15.

Заједничко свим амфорикарполидима је слободна или естерификована (ацетат, изовалерат или сенеционат) ОН група на α -оријентисаном С(15)- H_2 угљенику. Поред тога, међу изолованим лактонима изоловано је и неколико са епоксидованим 10(14) или 11(13) двоугубим везама, као и производима отварања 11(13) епоксидног прстена (18–21, Слика 14). Квантитативном ^1H NMR методом нађен је висок садржај амфорикарполида ($\geq 1\%$, обрачунато на укупну суву масу), при чему се највећи део ових лактона налази на површини листова (Jadranin et al., 2013). С обзиром на то да амфорикарполиди показују јаке антифунгалне (Jadranin et al, 2013) и антибактеријске активности [10], може им се



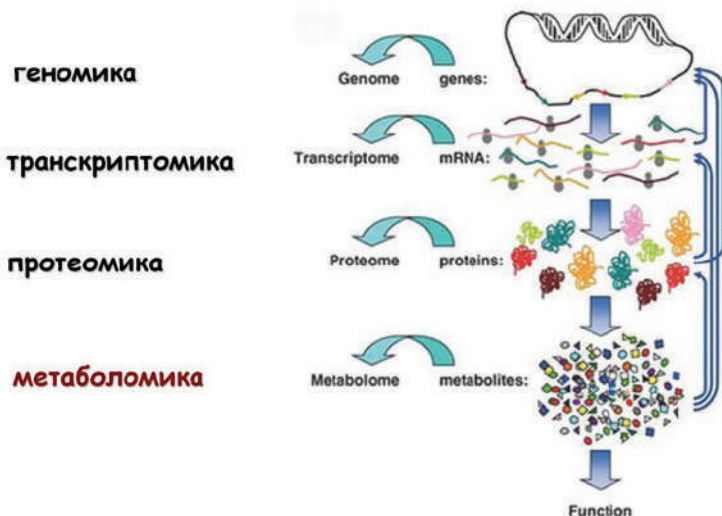
Слика 16. Мајклова (Michael) адиција био-нуклеофила на 11(13)-двоугубу везу γ -лактонског прстена.

приписати и заштитна улога против гљивичних и других патогена. Неколико амфорикарполида је показало активност и цитотоксичност против ћелија рака грлића материце (ћелијске линије HeLa) и меланома на мишевима (ћелијске линије B16) [2]. Биолошке активности сесквитерпенских лактона приписују се коњугованој егзометиленској 11(13)-двоугубој вези γ -лактонског прстена која ступа у реакцију Мајклове адиције са био-нуклеофилима (Слика 16).

4.2. Метаболомичка студија рода *Amphoricarpus*

Поред наведених (фитохемијских) истраживања, овај род је код нас тренутно предмет и метаболомичке студије као предмет још једне докторске дисертације (Мирјана Цветковић).

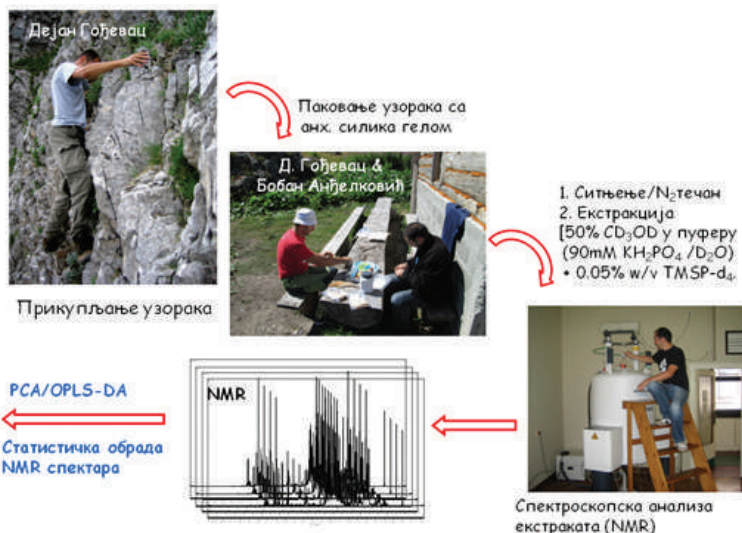
Метаболомика је нова научна мултидисциплинарна област која обухвата различите аспекте биологије, хемије и математике. Користи модерне спектроскопске и хроматографске технике (NMR, IR, MS, GC, LC) и статистичку (мултиваријантну) анализу података (PCA) с циљем да се измери квантитативно и квалитативно што је могуће више метаболита (*метаболом*) у испитиваном организму и на тај начин добије јасна метаболничка слика под датим условима. Метаболомика пружа директан „функционални извештај о физиолошком стању“ испитиваног организма у датом тренутку (Слика 17). Веза између метаболомике и других нових биоинформатичких наука (геномика, транскриптомика и протеомика) које су се такође развиле у другој половини 20. века, приказана је на Слици 14. Метаболомика налази примену у многим областима, као што су медицина, физиологија, биологија, екологија, биотехнологија...



Слика 17. Међусобна повезаност метаболомике са другим сродним биоинформатичким методама.

Наша метаболомичка студија рода *Amphoricarpos* имала је два циља: (1) нова сазнања о таксономском статусу рода (4.2.1) и (2) развој једноставне методе за идентификацију биолошки активних једињења у биљном екстракту (4.2.2).

4.2.1. Хемотаксономска студија рода *Amphoricarpos* применом метаболомике



Слика 18. Експериментални поступак хемотаксономске студије рода *Amphoricarpos*.

Експериментални поступак ове метаболомичке студије који је детаљно описан у раду [6] обухвата следеће фазе (Слика 18): (1) прикупљање узорака, (2) брзо сушење узорака помоћу анх. силика гела, (3) припрема екстракта за NMR анализу, (4) снимање 1H NMR спектра и (5) статистичка обрада снимљених спектра.

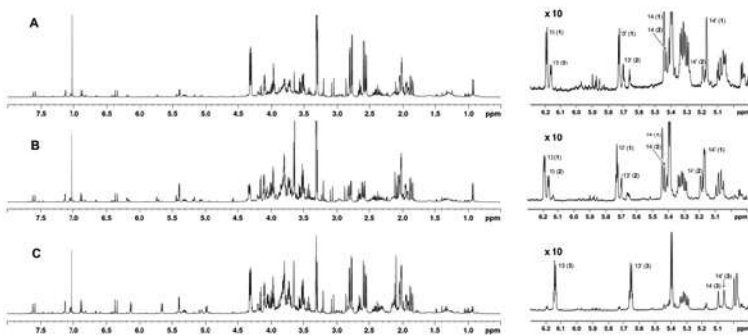
(1) Узорци листова (укупно 58) сва три таксона (Блечић и Мајер) су прикупљени јула 2014. године за време периода цветања у Црној Гори, на седам локација (Сињајевина, Ловћен, Кањон Таре, Планиница, Виситор, Вратло, Орјен).

(2) Непосредно по брању узорци су херметички затварани у пластичне кесе заједно са анхидрованим силика гелом са

циљем да се што је брже могуће уклони вода и тиме спречи да ензими хемијски промене узорак.

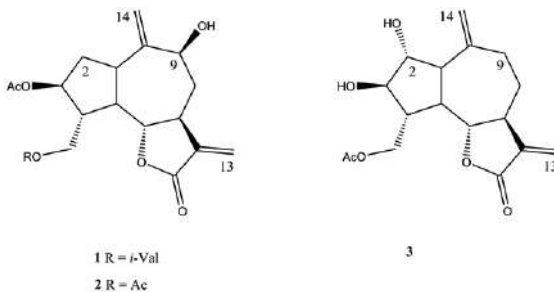
(3) Осушени листови су иситњени у лабораторијском млину под течним азотом и затим екстраховани смешом деутерисаног метанола у D_2O (1:1) уз додаток пуфера и интерног NMR стандарда – TMS $P-d_4$ (Слика 18).

(4) Сви 1H NMR спектри су снимљени на 500 MHz под истим условима. Типични спектри узорака сва три испитивана таксона приказани су на Слици 19.



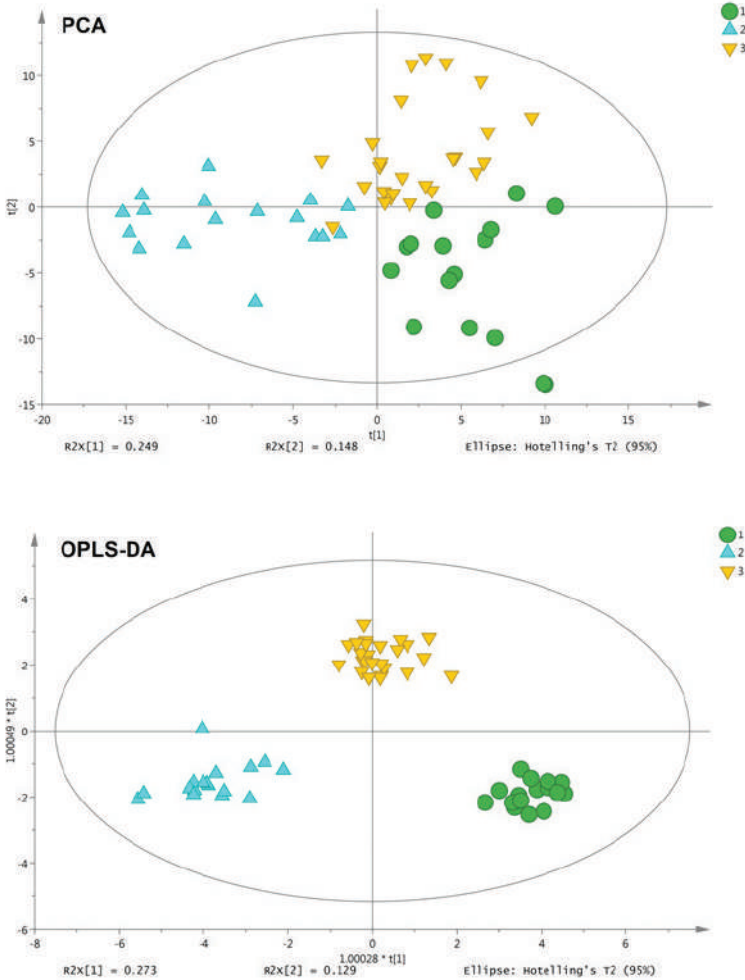
Слика 19. Примери 1H NMR спектра екстракта сва три испитивана таксона; (A) – *A. autariatus* ssp. *autariatus*, (B) – *A. autariatus* ssp. *bertisceus*, (C) – *A. neumayeri*; карактеристични сигнали амфорикарполида у спектралној области δ 4.9–6.3 увећани су 10 пута (десни део слике) [6].

Идентификација компоненти екстракта у 1H NMR спектрима заснована је на поређењу са спектрима референтних једињења, претходно изолованих у нашим лабораторијама, као и са спектрима познатих једињења из библиотеке спектра



Слика 20. Сесквитерпенски γ -лактони, амфорикарполиди, идентификовани у испитиваним екстрактима рода *Amforicarpos*.

[20]. Преклопљени NMR сигнали раздвајани су помоћу дво-димензионалних (2D) NMR метода (COSY, TOCSY, ROESY, HSQC и HMBC). Као главни хемотаксономски маркери детектовани су амфорикарполиди хидроксиловани у 2α -(1) и 9β -положајима (2 и 3) амфорикарполиди (Слика 20).



Слика 21. Резултати статистичке PCA и OPLS/DA анализе NMR спектра екстракта рода *Amphoricarpos*: 1 – *A. autariatus* ssp. *autariatus*, 2 – *A. autariatus* ssp. *bertisceus*, 3 – *A. neumayeri*. [6].

(5) Статистичка обрада NMR спектра мултиваријантном анализом, применом метода PCA (Principal Component Analysis) и OPLS (Orthogonal Partial Least Squares)/DA (Discriminant Analysis), извршена је помоћу софтвера SIMCA (version 14, Umetrics, Umeå, Sweden). Примена ових метода омогућила је јасну диференцијацију три таксона – две врсте од којих је једна подељена у две подврсте, што се види из графика на Слици 21.

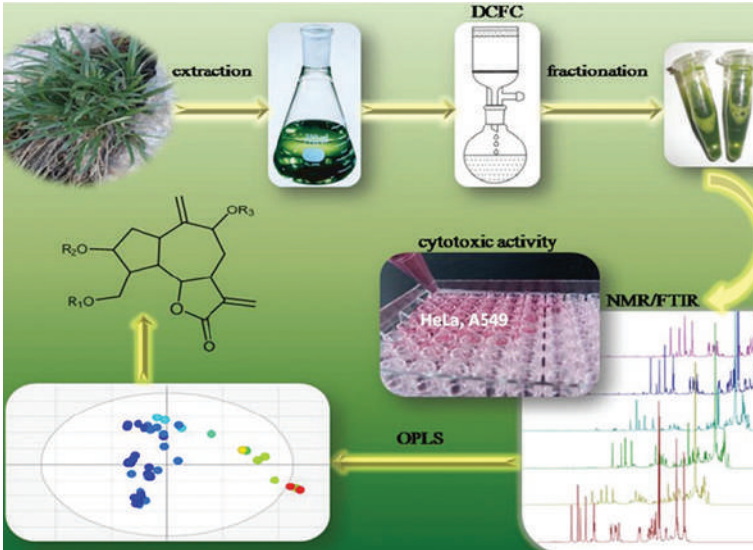
На основу садржаја главних хемотаксономских маркера, то јест 2α -ОН (1) и 9β -ОН (2 и 3) амфорикарполида извршено је диференцирање између две врсте. Лактон 1 преовлађује у *A. neumayeri* док су 2 и 3 карактеристични за *A. autariatus*. Истовремено различит однос садржаја хлорогенске и јабучне киселине омогућио је раздвајање две *A. autariatus* подврсте. У подврсти *bertisceus* хлорогенска киселина је у вишку, док је код подврсте *autariatus* доминантна јабучна киселина. Према томе, ови резултати су у сагласности са закључцима које су раније извели Блечић и Мајер (1967) на основу морфолошких карактеристика рода.

4.2.2. Метаболомичка идентификација цитотоксичних метаболита из *A. autariatus ssp. autariatus* применом комбинације хроматографија/спектроскопија/биолошки *in vitro* тестови (сарадња са Институтом за онкологију и радиологију Србије)

Примењена је комбинација брзе хроматографије на сувој колони (енгл. Dry Column Flash Chromatography, DCFC), две спектроскопске методе (NMR и FTIR) и тестова цитотоксичности (на HeLa и A549 ћелије грлића рака материце, односно плућног карцинома) (Слика 22). Примењена DCFC метода са силика гелом као стационарном фазом уобичајена је хроматографска (и релативно јефтина) препаративна техника за прелиминарно и брзо раздвајање сложених екстраката на више фракција према поларности.

Иситњени осушени листови *A. autariatus ssp. autariatus* екстраховани су на собној температури смешом CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). Екстракт је раздвојен на 13 фракција елуирањем (DCFC) које је започето са чистим CH_2Cl_2 , после чега је поларност постепено повећавана додатком MeOH (све до

20%). Ово хроматографско раздвајање је рађено у трипликату. Све раздвојене фракције су анализирани применом две спектроскопске методе, ^1H NMR и FTIR. Истовремено је испитано *in vitro* цитотоксично дејство сваке фракције на HeLa и A549 ћелије. Применом OPLS мултиваријантне анализе корелисана је цитотоксична активност са хемијским саставом фракција. Обе примењене спектроскопске методе дале су подударне резултате. Најактивније фракције (тамноплаве мрље груписане на графикау, Слика 22) су оне које садрже сесквитерпенске лактоне – амфорикарполиде 1 и 2 са хидроксилном групом у 9β -положају, што је у складу са нашим ранијим испитивањем цитотоксичности неких амфорикарполида из рода *Amphoricarpus* [2].



Слика 22. Поступак метаболичке идентификације цитотоксичних фракција надземних делова екстракта *A. autariatus ssp. autariatus* (кањон Таре).

Захвалница

Захваљујем Данијелу Винцеку (Ботаничка башта планинске флоре Црне Горе, Дуловине, Колашин), Милутину-Мићи

Прашчевићу (Ботаничка башта „Велемун“, Брезојевице, Плав), мр. Халилу Маркишићу и Омку Курпејовићу из Рожаја, на несебичној помоћи коју су нам пружили приликом прикупљања узорака планинске флоре Црне Горе. Велику захвалност дугујемо академику Владимиру Стевановићу и професору Петру Марину (Биолошки факултет, Ботаничка башта „Јевремовац“, Универзитет у Београду) који су идентификовали већину испитиваних биљака. Такође изузетну захвалност дугујемо професору Слободану Мацури (Клиника Мејо, Рочестер, Минесота, САД) који је снимао NMR спектре наших супстанци у току дужег периода када то код нас није било могуће.

Литература

- [1] Aljančić, I.S., V.E. Vajs, V.V. Tešević, S. M. Milosavljević. “Some Wild Growing Plant Species from Serbia and Montenegro as the Potential Sources of Drugs”. *Current Pharmaceutical Design* 14 (2008): 3089–3105.
- [2] Atrog, A. A. B., M. Natić, T. Tosti, D. Milojković-Opsenica, I. Djordjević, V. Tešević, M. Jadranin, S. Milosavljević, M. Lazić, S. Radulović, Ž. Tešić. “Lipophilicity of some guaianolides isolated from two endemic subspecies of *Amphoricarpos neumayeri* (Asteraceae) from Montenegro”. *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009): 250–256.
- [3] Blečić, V., E. Mayer. “Die Europäischen Sippen der Gattung *Amphoricarpos Visiani*”. *Phyton (Austria)* 2 (1967): 150–158.
- [4] Caković, D., D. Stešević, P. Schonswetter, B. Frajman. “How many taxa? Spatiotemporal evolution and taxonomy of *Amphoricarpos* (Asteraceae, Cardioideae) on the Balkan Peninsula”. *Org Divers Evol.* 15 (2015) 429–445.
- [5] Cvetković, M., I. Đorđević, M. Jadranin, V. Vajs, I. Vučković, N. Menković, S. Milosavljević, V. Tešević. “Further Amphoricarpolides from the surface extracts of *Amphoricarpos* complex from Montenegro”. *Chem. Biodivers.* 11 (2014): 1428–1437.
- [6] Cvetković, M., B. Anđelković, V. Stevanović, M. Jadranin, I. Đorđević, V. Tešević, S. Milosavljević, D. Godevac. “NMR-based metabolomics study of *Amphoricarpos* species from Montenegro”. *Phytochemistry Lett.* 25 (2018): 1–5.
- [7] Djordjević, I., V. Vajs, V. Bulatović, N. Menković, V. Tešević, S. Macura, P. Janačković, S. Milosavljević. “Guaianolides from two subspecies of *Amphoricarpos neumayeri* from Montenegro”. *Phytochemistry* 65 (2004): 2337–2345.
- [8] Đorđević, I. *Usporedno ispitivanje hemijskog sastava biljnih vrsta rodova Cicerbita i Amphoricarpos : doktorska disertacija.* 2005. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.

- [9] Djordjević, I., M. Jadranin, V. Vajs, N. Menković, V. Tešević, S. Macura, S. Milosavljević. "Further guaianolides from *Amphoricarpos ne umayeri* ssp *murbeckii* from Montenegro". *Z. Naturforsch. B Chem. Sci.* 61 (2006): 1437–1442.
- [10] Gavrilović, M., Soković, M. D. Stanković, M., Marin, P. D., Dajić-Stevanović, Z., Janačković, P. "Antimicrobial and antioxidative activity of various leaf extracts of *Amphoricarpos* Vis. (Asteraceae) taxa", *Arch. Biol. Sci.* 68 (2016): 803–810.
- [11] Grierson, A. J. C. "Amphoricarpos Vis.". In: Davis, P. H. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 5. Edinburgh: Edinburgh University Press, 1975. Pp. 595–596.
- [12] Jadranin, M., *Sekundarni metaboliti biljnog roda Amphoricarpos : magistarska teza*. 2007. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet.
- [13] Jadranin, M., Đorđević, I., Tešević, V., Vajs, V., Menković, N., Soković, M., Glamočlija, J., S. Milosavljević. "Sesquiterpene Lactones of *Amphoricarpos autariatus* ssp. *autariatus* from Montenegro – Antifungal Leaf-Surface Constituents". *Rec. Nat. Prod.* 7 (2013): 234–238.
- [14] Milosavljević, S., Bulatović, V., Stefanović, M. "Sesquiterpene Lactones from the Yugoslavian wild growing plant families Asteraceae and Apiaceae". *J. Serb. Chem. Soc.* 64 (1999): 397–442.
- [15] Šavikin, K., T. Janković, D. Krstić-Milošević, N. R. Menković, S. M. Milosavljević. "Secondary Metabolites and Biological Activities of Some Gentianaceae Species from Serbia and Montenegro". In: Gupta, V. K., Taneja, S. C. Gupta B. D. (Eds.). *Comprehensive bioactive natural products extraction, isolation & characterization*. Vol. 6. Studium Press LLC, USA, 2010. Pp. 323–340.
- [16] Shetekauri, S., L. Kutateladze. "Diversity, ecotopology and hypsometric distribution of the endemic flora in high-mountain phytolandscapes of the Caucasus". *Earth Sciences* 6 (2017): 38–48.
- [17] Šavikin, K., I. S. Aljančić, V. E. Vajs, S. M. Milosavljević, M. Jadranin, I. Đorđević, N. R. Menković. "Bioactive Secondary Metabolites in Several Genera of Gentianaceae Species from the Central Regions of the Balkan Peninsula". In: Rybczyński, J. J., Davey, M. R., Anna M. (Eds.). *The Gentianaceae – Vol. 2: Biotechnology and Applications*. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2015. Pp. 319–348.
- [18] Vajs, V., A. Jokić, S. Milosavljević. "Artemisinin Story from the Balkans". *Nat. Prod. Commun.* 12 (2017): 1157–1169.
- [19] Webb, D. A. 1972. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters S. M. Eds., *Flora Europaea Amphoricarpos vis.*, Cambridge, University Press, MA4, p. 208.
- [20] Wishart, D. S., D. Tzur, C. Knox, R. Eisner, A. C. Guo, N. Young, D. Cheng, K. Jewell, D. Arndt, S. Sawhney et al. "HMDB: the human metabolome database". *Nucleic Acids Res.* 35 (2007): D521–D526.