

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД

год. 53

бр. 6 (децембар)

YU ISSN04406826

UDC 54.001.93

ХЕМИЈСКИ ПРЕГЛЕД CHEMICAL REVIEW



Годиште 53

број 6
децембар

Editor-in-Chief
RATKO M. JANKOV
Deputy Editor-in-Chief
DRAGICA TRIVIĆ

Volume 53
NUMBER 6
(December)

Publisher
SERBIAN CHEMICAL SOCIETY
Belgrade/Serbia, Karnegijeva 4

Издаје
СРПСКО ХЕМИЈСКО ДРУШТВО

Телефон 3370-467

Карнегијева 4

излази двомесечно

ОДГОВОРНИ И ГЛАВНИ УРЕДНИК
Ратко М. Јанков

ПОМОЋНИК ОДГОВОРНОГ И ГЛАВНОГ
УРЕДНИКА
Драгица Тривић

ЧЛАНОВИ РЕДАКЦИЈЕ
Владимир Вукотић, Бранко Дракулић, Јелена Радосављевић
и Воин Петровић

УРЕЂИВАЧКИ ОДБОР

Иван Гутман, Снежана Зарић, Јован Јовановић, Славко
Кеврешан, Драган Марковић, Радо Марковић, Владимир
Павловић, Радомир Салчић, Живорад Чековић (пред-
седник).

Годишња чланарина, укључује часопис „Хемијски преглед”,
за 2012. годину износи:
- за запослене..... 1.800,00
- за пензионере, студенте, ђаке и незапослене..... 800,00
- претплата за школе и остале институције..... 3.500,00
- за чланове и институције из иностранства. € 50

Чланарину и претплату можете уплатити на рачун СХД:
205-13815-62, позив на број 320.

Web site: <http://www.shd.org.rs/hp/>
e-mail редакције: hempred@chem.bg.ac.rs

Припрема за штампу: Јелена и Зоран ДИМИЋ,
Светозара Марковића 2, 11000 Београд

Штампа: РИЦ графичког инжењерства Технолошко-
металуршког факултета Београд, Карнегијева 4

Насловна страна и Интернет верзија часописа:
Слободан и Горан Ратковић, RatkovicDesign
www.ratkovicdesign.net
office@ratkovicdesign.net

САДРЖАЈ

ЧЛАНЦИ

Ана МИЈУШКОВИЋ, Михајло Б. СПАСИЋ
Ana MIJUŠKOVIĆ, Mihajlo B. SPASIĆ
РЕЦЕПТОРИ СПРЕГНУТИ СА G ПРОТЕИНИМА - НОБЕЛОВА
НАГРАДА ЗА ХЕМИЈУ 2012.
*THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2011. FOR STUDIES OF G –
PROTEIN COUPLED RECEPTORS* 142

Милена ЧАВИЋ
Milena ČAVIĆ
УЛОГА ЂЕЛИЈСКОГ СТАРЕЊА У РАЗВОЈУ И ТЕРАПИЈИ
МАЛИГНИХ ОБОЉЕЊА
*THE ROLE OF CELLULAR AGING IN THE DEVELOPMENT
AND TREATMENT OF MALIGNANT DISEASES* 147

Романа МАСНИКОСА
Romana MASNIKOSA
ТЕХНИКЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ СТРУКТУРЕ ГЛИКАНА
*TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF GLYCAN
STRUCTURE* 152

Наташа ПЕЈИЋ
N. PEJIĆ
ЗЕЛЕНА ПРИЧА О АЛКИЛ ПОЛИГЛИКОЗИДИМА
GREEN STORY ABOUT ALCYL POLYGLYCOSIDES 158

ХЕМИЈА У ШКОЛИ

Бранко Ј. ДРАКУЛИЋ
Branko J. DRAKULIĆ
БОЛНО УЧЕЊЕ ХЕМИЈЕ САВРЕМЕНИМ НАСТАВНИМ
СРЕДСТВИМА
*PAINT OR PAIN? A WORD ON “UTILIZATION OF
CONTEMPORARY MEANS IN TEACHING CHEMISTRY-
COMPUTERS, COMPUTER PROGRAMS AND
INTERNET”, HP 2/2012* 164

ВЕСТИ ИЗ СХД

СВЕЧАНА СКУПШТИНА
СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА 166
ИЗВЕШТАЈ СА ПРВЕ КОНФЕРЕНЦИЈЕ
МЛАДИХ ХЕМИЧАРА СРБИЈЕ 167
ОДЛУКА О ЧЛАНАРИНИ ЗА 2013. 168
6. СИМПОЗИЈУМ ХЕМИЈА И ЗАШТИТА ЖИВОТНЕ
СРЕДИНЕ 168



УВОДНИК

Децембарски број *Хемијској љрепедга* последњи је у овој години. Имамо разлог за задовољство, пошто нам је 2012. година била успешна. Надам се да ће нам наредна година бити још успешнија. А разлог за задовољство су и бројни интересантни чланци у овом броју. Ево само пар најва.

* * *

Овај број Хемијског прегледа почиње актуелном информацијом о Нобеловој награди за 2012. Годину, чланком "Рецептори *сиреиуи* са *G љроџеи*нима - Нобелова награда за хемију 2012", аутора **Ане Мијушковић** и **Михајла Б. Спасића** из Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић", БУ. Нобелова награда за хемију додељена је америчким научницима Роберту Лефковицу (Robert Lefkowitz) и Брајану Кобилки (Brian Kobilka) за открића која су се догодила највише током осамдестетих година прошлог века и изузетно допринела разумевању структуре и функције рецептора спрегнутих (упарних) са *G* протеинима, тј. GPCR (од енгл. *G protein-coupled receptors*). Њихов рад је обухватио поред хемијских и бројне генетичке и биохемијске аспекате ових рецептора и тиме поставио основе за схватање модерне физиологије – како ћелије у различитим деловима организма реагују другачије у односу на спољни стимулус.

* * *

У чланку "Улога ћелијској старења у развоју и љераији малићних обољења" **Милене Чавић** са Института за онкологију и радиологију Србије, прочитаћете који најважнији фактори узрокују старење, које се дефинише као скуп свих промена и процеса у последњој фази животног циклуса. Физиолошко старење ћелија је нераскидиво повезано са развојем тумора и у њих се убрајају скраћивање теломера, тумор супресори, онкогени, механизми поправке оштећења ДНК, реактивне кисеоничне врсте, глукоза, протеини топлотног шока итд. Старење ћелије има двојну улогу у туморигенези, заштитну и промотивну. С обзиром на то да туморске ћелије често развијају резистенцију на стандардни вид терапије која индукује апоптозу, потражени су нови приступи да ћелија престане да се дели, што се показао успешним у лечењу неких типова тумора.

* * *

У раду под насловом "Технике за одређивање *сирукџуре гликана*" **Романе Маснићкоса**, из ИНЕП-а БУ, који представља наставак интересантног рада из претходног броја *Хемијској љрепедга* о анализици гликана, објашњени су различити приступи одређивању структуре *N*-гликана везаних за протеине. Описане су

специфичне хемијске, ензимске и друге аналитичке стратегије, као и технике масене спектрометрије, које се користе за одређивање комплетне примарне структуре гликана. Избор технике и методе за одређивање структуре гликана зависи од тога колико материјала имамо на располагању, која му је чистоћа и из ког извора потиче (нпр. узорци ткива или ћелије у култури). Ако материјала има довољно, може се одредити комплетна примарна структура гликана у том узорку. Чешћи је случај да узорка нема довољно или да узорак није довољно пречишћен, те се прибегава делимичној карактеризацији гликана у узорку. Како напредује технологија, тако се повећава и осетљивост метода за одређивање структуре гликана.

* * *

Колегиница **Наташа ПЕЈИЋ** са Фармацеутског факултета Универзитета у Београду, у чланку под насловом "Зелена љрича о алкил љолићликозидима" описује зелене сурфактанти, што су површински активне материје ("природни детерџенти") који се добијају из биљних уља и биљних угљених хидрата и представљају основне састојке различитих биоразградивих и биокompatибилних производа. Њихово коришћење је одговор на све већу потражњу за производима који су "зеленији", блажи и ефикаснији, због чега је добијање зелених сурфактаната из природно обновљивих извора концепт који се све више користи у индустрији детерџената и козметичи. У овом контексту алкил полиглицозиди (АПГ) су кључни зелени сурфактанти чија употреба представља одлично решење чији је циљ комбиновање ефикасности и безбедности у финалном производу.

* * *

У овом броју *Хемијској љрепедга* у рубрици *Хемија из/за школе* имамо полемички текст је чланак под насловом "Болно учење хемије савременим наставним средствима" аутора **Бранка Дракулића** (ИХТМ, Београд) који прави остврт на текст "Примена савремених наставних средстава у области хемије – рачунари, рачунарски програми и интернет" *Хемијски љрепед* 53 (2012) стр 51, али и шире анализира узроке одбојности према хемији, који, по аутору, произилазе пре свега из апстрактних појмова, сложености и апстрактности атомских и молекулских структура и процеса који се одвијају на атомском нивоу. Ова разматрања терају на размишљање јер покрећу важна питања о образовању ученика из природних наука – питања на која нема лаког нити једно-дисциплинарног одговора.

Ратко М. Јанков



ЧЛАНЦИ

Ана МИЈУШКОВИЋ, Михајло Б.СПАСИЋ, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић” Универзитет у Београду, е-маил: ana.m.mijuskovic@gmail.com; ana.mijuskovic@ibiss.bg.ac.rs



РЕЦЕПТОРИ СПРЕГНУТИ СА G ПРОТЕИНИМА - НОБЕЛОВА НАГРАДА ЗА ХЕМИЈУ 2012.

УВОД

Нобелова награда за хемију¹ додељена је америчким научницима (Слика 1.) Роберту Лефковицу (Robert Lefkowitz) и Брајану Кобилки (Brian Kobilka) за открића, која су се догодила највише током осамдестетих година прошлог века и изузетно допринела разумевању структуре и функције рецептора спрегнутих (упарених) са G протеинима GPCR (од енгл. *G protein-coupled receptors*). Њихов рад је обухватио, поред хемијских, бројне генетичке и биохемијске аспекате ових рецептора и тиме поставио основе за схватање модерне физиологије – како ћелије у различитим деловима организма реагују другачије у односу на спољни стимулус.



Слика 1. Добитници Нобелове награде за хемију 2012. године. Роберт Лефковиц и Брајан Кобилка, САД.

Ћелијска способност процесовања информација у виду различитих хемијских (хормони, неуротрансмитери, фактори раста, одоранти) или физичких сигнала (светлост) обезбеђена је постојањем рецептора на њеној површини. Већина ових сигнала никада директно не улази у ћелију. Ови рецептори, односно фини ћелиј-

ски сензори, интерагују са “бори се или бежи” хормоном адреналином (амерички епинефрин), као и са светлошћу, норадреналином, допамином, серотонином и посредују у ефектима око половине данас коришћених лекова, укључујући бета блокаторе, антихистаминике и различите лекове у психијатрији.

Предуслов за одржање хомеостазе у живом организму представља фино регулисана комуникација између различитих ћелија. Систем преноса бројних спољашњих и унутрашњих сигнала регулише физиологију организма и интегрише је са потребама организма. Ћелијски пренос сигнала обухвата све биолошке и биохемијске феномене који повезују ћелијску перцепцију сигнала са адекватним одговором. Разумевање преноса ванћелијских и унутарћелијских сигнала је од кључне важности за разумевање биолошких процеса попут ћелијске диференцијације, пролиферације и опстанка. Ефикасност и веродостојност овог процеса омогућена је постојањем рецептора, главних посредника у комуникацији. Већина екстраћелијских сигналних молекула, попут хормона и неуротрансмитера интерагује са тропотеинским трансмембранским сигналним системом који се са састоји од рецептора, G протеина и ефектора. Ове појединачне компоненте интерагују секвенцијално и реверзибилно. Сигнализација посредвана G протеинима представља комплексну мрежу сигналних путева са дивергентним и конвергентним корацима преноса у свакој тачки њиховог спрезања.

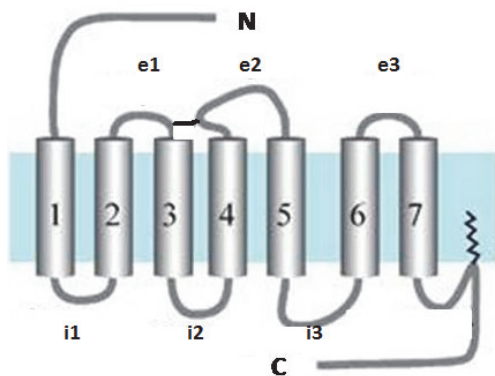
На Хемијском факултету Универзитета у Београду ова област истраживања је предмет курса Регулација биохемијских процеса (1403Б) на III години студијске групе Дипломирани Биохемичар. Процес сигналне трансдукције који укључује рецепторе спрегнуте са G протеинима описан је и у литератури за курс².

Са хемијске тачке гледишта GPCR пружају врхунски пример молекулске машине чија смо начела функционисања тек почели да разумевамо пре свега захваљујући кристалографским студијама ових рецептора.

О РЕЦЕПТОРИМА СПРЕГНУТИМ СА G ПРОТЕИНИМА

GPCR-ори представљају широку фамилију интегралних мембранских протеина које кодира хумани геном, а препознати су од стране бројних лиганда, укључујући пептиде, хормоне, липиде и нуклеотиде. Они су молекулски окидачи, важни у скоро свим физиолошким и вероватно патофизиолошким процесима. Проводе информацију добијену од неког од различитих стимулуса (лиганда, агониста) у промену количине унутарћелијског секундарног гласника који се тумачи као смислени сигнал од стране ћелије. Овај процес подразумева спрезање агонист активираних GPCR са варијететима ефекторног система а посредством интеракција са хетеротримерним протеинима (гуанин дифосфат-гуанин трифосфат везујућим). G протеини се састоје од G α , G β и G γ подјединица који у прецизној комбинацији одређују ћелијски одговор на рецепторску активацију. Додатни протеински ефекторни молекули и нивои комплексности и различитости постоје у нисходним ефектима активације датих рецептора.

Дуго времена није било могуће изучити детаљну структуру GPCR због великих потешкоћа у вези њихове кристализације. Они су мембрански везани протеини који пролазе кроз мембрану ћелија у виду седам алфа хеликса који су повезани петљама (Слика 2), три на унутарћелијској и три на ванћелијској страни. Како су GPCR, мембрански протеини, сваки покушај да се извуку из мембране за резултат има уништење њиховог интегритета. Шест петљи су парцијално слободне и велики је изазов лоцирати их, јер се испоставило да су оне важне детерминанте у молекулом везивању. Ови рецептори постоје у два стања – активном и неактивном, а кристализација активног стања представља тежак подухват због његове нестабилности.



Слика 2. Рецептори спрегнути са G протеинима - седам трансмембранских сегмената

До сада позната функција рецептора спрегнутих са G протеинима је катализовање ослобађања чврсто везаног GDP са алфа субјединице G протеина. Везивање агониста за рецептор на спољашњој страни доводи до комплексне серије покрета хеликса што резултује конформационом променом рецептора која фаворизује спрезање са G протеином и убрзава измену гуанин нуклеотида. Након тога, активирани субјединице пози-

тивно или негативно регулишу активност ефекторних ензима или јонских канала^{3,4}. Крајњи резултат је често продукција цикличног аденозин моно фосфата (сАМР) који може да се транслоцира и до нуклеуса, утичући тако и на ниво експресије одређеног гена а онда и пратећег трајног физиолошког одговора.

Активација агонистом резултује не само у активацији зависној од G протеина, већ и у низу молекуларних догађаја који обезбеђују:

- 1) повратну регулацију
- 2) рецепторску ендоцитозу
- 3) сигналинг посредован преносним путевима независним од G протеина^{5,6,7}

Гликозилација и грађене дисулфидне везе између екстрацелуларних петљи рецептора e1 и e2 могу бити важна особина за одговарајућу локацију у мембрани. Бројне варијације ове основне структуре утврђене су код различитих лиганда (ретинонала, моноамина, дво-валентних катјона, мириса, пептидпротеаза и глико-протеинских хормона) који се везују за ову класу рецептора. Те разлике такође одређују и врсту G протеина за коју ће се одређени рецептор купловати. N-терминални део ових рецептора показује знатне разлике у дужини и само код најдужих постоји сигнална секвенца. Релативна величина C-терминалног дела и из петље такође показује изразите разлике. Постоје и разлике у броју и тачним местима гликозилације. Места везивања агониста и места купловања са G протеинима код ове врсте рецептора не могу се прецизно утврдити без одређивања тродимензионалне структуре рецептора. Међутим, кад је у питању везивање агониста као што су моноамини, анализе добитника награде указују да је место везивања у цепу који формирају трансмембрански хеликси. Интрацелуларне петље и C терминални део су критична места за интеракцију са G протеинима али релативна важност појединих региона као што је из одређивању специфичности спрезања за G протеин варира унутар ове класе рецептора.

Хетеротримерни G протени посредују ефекте различитих биолошких сигнала и бројних медицински важних фармацеутских једињења. Многи G протеини посредовани сигнални путеви постају неосетљиви после продужене стимулације. Описано је неколико молекуларних механизма који инхибирају сигнал трансдукцију преко G протеина. Киназе могу специфично фосфорилисати лиганд везане, са G протеинима спрегнуте рецепторе, дозвољавајући протеинима из групе арестина канала^{8,9} да се везују за фосфорилисане рецепторе спречавајући их да активирају G протеине. Овај тип фосфорилације рецептора изгледа да је одговоран за брзу инактивацију преноса сигнала.

ПУТ КОЈИМ ЈЕ УТВРЂЕНА СТРУКТУРА И ФУНКЦИЈА ОВИХ РЕЦЕПТОРА

Како је већ споменуто, изучавање мембранских протеина, особито у кристализованом стању представља велики подухват. Одувек су представљали проклетство кристалографа а GPCR је био нарочито непослушан. Структурна анализа GPCR била је отежана њихо-

вом малом природном заступљеношћу, инхерентном структурном флексибилношћу као и нестабилношћу у растворима детергената. Почетком деведесетих, низ пробоја омогућио је њихову детаљну карактеризацију и оба овогодишња Нобелова лауретата, дала су кључни допринос.

Мапирањем хуманог генома откривено је скоро хиљаду гена који кодирају за GPCR. Скоро половина ових рецептора осетљиви су на мирисе и део су олфакторног система. Трећина су рецептори за хормоне и сигналне супстанце попут допамина, серотонина, простагландина, глутагона и хистамина. Неки рецептори важни су у процесу вида, други су лоцирани на језику и важни су за наше чуло укуса. Преко стотину рецептора су и даље изазов за науку, будући да њихова сврха још увек није дефинисана. Поред открића многих варијација рецептора, Лефковиц и Кобилка открили су њихову мултифункционалност - један рецептор може да препозна неколико различитих хормона у спољашњости. У унутрашњости, они не реагују само са G протеинима, већ и протеинима названим арестини. Ови пробоји не само да су открили детаљан механизам функционисања рецептора већ су отворили пут дизајну лекова. У последњих дванаест година више структура GPCR је решено – допамински рецептор, 5HT₄ хемокински рецептор за кога се сматра да је укључен у HIV инфекцију, аденозински A₂ рецептор који везује кофеин и недавни опијумске рецепторе који учествују у везивању морфијума. У ствари, већина ових структура је решена тако што су неки лекови везани за њих па зато представљају полазне тачке од непроцењиве вредности за дизајн више потентних лекова са бољим безбедосним профилима.

КРАТАК ИСТОРИЈСКИ ПРЕГЛЕД РАЗВОЈА ИСТРАЖИВАЊА КОЈА СУ НАГРАЂЕНА НОБЕЛОВОМ НАГРАДОМ

Крајем 19. века почели су експерименти са изучавањем ефеката адреналина, откривено је да доводи до повећања крвног притиска и срчаног рада. То је указивало да су нерви одговорни за ове ефекте. Како парализовани нервни систем код експерименталних животиња, није блокирао ефекте адреналина, било је очигледно постојање неке врсте рецептора који обезбеђују ћелији осетљивост на хемијске супстанце. Класична теорија о рецепторима развијена је на бази закона о дејству маса и дозно зависним кривим, добијеним техником изолованих органа. Трагање за овим рецепторима било је деценијама безуспешно. Адреналин примењен на спољашност ћелије доводио је до мерљивих промена у метаболизму унутар ћелије.

Наметнула су се основна питања: Како је сигнал прошао кроз липидни двослој? Како то ова два света комуницирају?

Рејмонд Алквист (Raymond Ahlquist) је четрдесетих година прошлог века успео да окарактерише ефекте супстанци структурних аналога адреналина на различитим органима и закључио следеће: морају постојати два типа рецептора за адреналин – једни су важни за

контраховање глатких мишића, а други подстичу рад срца. Назвао их је алфа и бета. Убрзо, потом, развијени су бета блокатори, данас добро познати лекови за срчана обољења. Премда су развијени лекови, који су испљавали ефекте преко неког рецептора или групе рецептора, о самим рецепторима није било података. Сада знамо зашто их је било тако тешко пронаћи - релативна малобројност и затвореност унутар зида ћелије, њихове су карактеристике. Након неколико деценија и сам Алквист, постаје збуњен својом теоријом. Писао је: “За мене они су апстрактан концепт замишљен да објасни уочене реакције ткива као одговор на даје супстанце”.

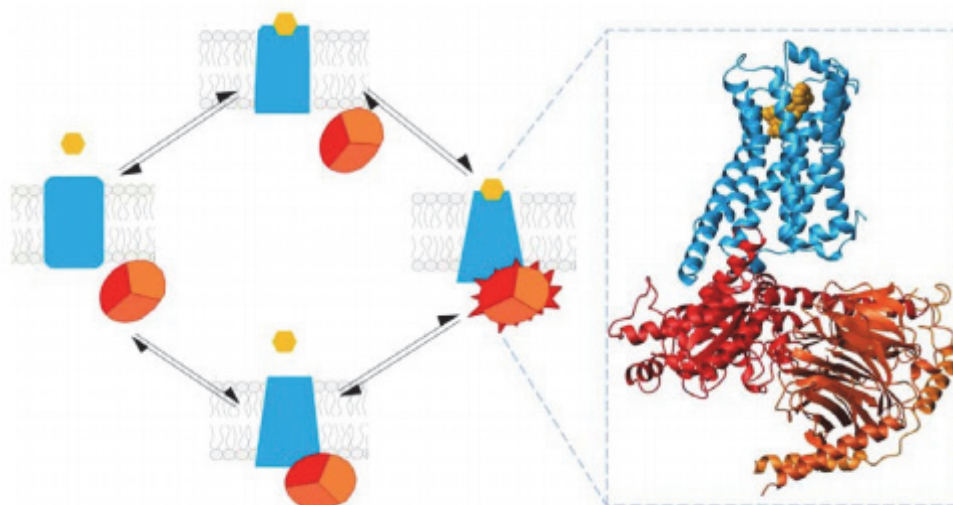
Неке од сигналних компоненти у ћелији биле су детаљно окарактерисане пре самих рецептора. То су сигнални гласник cAMP, ензим аденилат циклаза (Нобелова награда за физиологију и медицину 1971), cAMP зависна протеин киназа и хетеротримерни G протеини (Нобелова награда за физиологију и медицину 1994).

Крајем шездесетих година прошлог века, Роберт Лефковиц је ушао у историју рецептора. Млади извршни студент, желео је да постане кардиолог. Његово дипломирање било је у време Вијетнамског рата, па је он војни рок служио у Националном институту за здравље. Ту му је представљен задатак: пронаћи рецептор! Његов ментор је већ имао план. Предложио је везивање радиоактивног јода за хормоне. Хемијска синтеза радиоактивно обележеног агониста постаће метода избора у доказивању постојања рецептора, његове детекције и визуелизације у плазма мембрани. Предложено му је да треба да покаже да је рецепторско купловање за површину ћелије окидач за процес који се дешава у њеној унутрашњости. Почео је рад са адренокортикотропним хормоном, који стимулише продукцију адреналина у жлезди надбубрега. Након овог успеха, фокусирао се на адреналин.

Ћелија реагује на адреналин посредством адренергичких рецептора којих има најмање девет. Различита ткива и органи на другачији начин реагују на повишене концентрације адреналина. Испуњење тадашњег главног циља дошло је са проналаском специфичних радиоактивно обележених лиганата. Радиалиганди су такође нашли своју примену у квантификавању и поређењу ефеката адренергичких једињења на активност адренергичких рецептора и аденилат циклазе. Проучавање термодинамичког спрезања између лиганда и G протеина обезбедили су увид у сам сигнални механизам.

Лефковиц и сарадници су осамдесетих година, предложили генералан механизам активације рецептора, познат као тернарни комплекс – екстраћелијског лиганда, трансмембранског GPCR и интраћелијских G протеина који је активациона јединица у сигналној каскади (Слика 3).

Рецепторски сигналинг почива на алостерном механизму, а алостерно спрезање је обострано и у складу се са термодинамиком овог процеса - везивање агониста повећава афинитет за G протеин унутар ћелије, а везивање G протеина повећава афинитет рецептора за везивање лиганда.



Слика 3. Модел тернарног комплекса

Изузетан допринос разумевању рецептора допринело је клонирање и секвенцирање првог рецептора за адреналин β адренергичког рецептора¹⁰. Истраживачком тиму се придружио млади доктор, постдок, Брајан Кобилка. Његова фасцинација адренергичким рецепторима настала је још док је радио у болничкој интензивној нези. Адреналин одређује разлику између живота и смрти. Кобилка је био јако заинтересован да изучи моћ адреналина на молекулском нивоу и решио да трагање започне анализом генома. Међутим, током осамдесетих, потрага за појединачним геном у огромном геному, технички је била велики изазов. Захваљујући деценијском труду групе Лефковица, који су установили методологију за изоловање β АР, било је могуће изоловати довољне количине овог мало заступљеног мембранског протеина за N – терминално аминокиселинско секвенцирање. На основу ове информације, конструисани су олигонуклеотиди који су употребљени за даље клонирање. Са великом посвећеношћу истраживачки тим на челу са Кобилком је почео да анализира код гена. Кобилка је успешно конструисао геномску ДНА библиотеку. Срећом, ген није имао интроне и целу секвенцу је било могуће добити. Установили су да рецептор има седам дугих хидрофобних спиралних сегмената – хеликса, што је имплицирало да он седам пута пролази кроз ћелијску мембрану. Седам, што је исти број као и број утврђен код различитих рецептора који су нађени у организму: светлосни родопсин у ретини ока. Овај искорак открио је велико изненађење – присуство седам трансмембранских хеликса заједно са хомологијом родопсинске секвенце имплицира да „ови рецептори могу бити на неки начин повезани и ако имају потпуно другачије функције“. Ова круцијална опсервација етаблирала је трансмембранску структуру GPCR. Роберт Лефковиц је ово касније окарактерисао као „прави еурека моменат“. Знао је да адренергички рецептори и родопсин интерагују са G протеинима у унутрашњости ћелије. Схватио је такође да 30 других рецептора функционише посредством G

протеина. Закључак се наметнуо: „Мора постојати комплетна фамилија рецептора који изгледају и функционишу на исти начин“. Ово откриће ударило је темеље данашњим сазнањима о GPCR, о томе како функционишу и како су регулисани на молекулском нивоу. Лефковиц и Кобика су били на челу овог научног путовања, а 2011. су публиковали нове резултате¹¹ који представљају круну њиховог рада. У његовој групи уврстиле су се бројне технике за руковање бета адренергичким рецептором. Лефковицев тим је био први који је идентификовао арестине који су способни за GPCR дерегулацију и контролу. Он се зато може сматрати оцем модерног истраживања GPCR.

Након изоловања гена, Брајан Кобилка се пресељено на Департман за медицину, Станфорд Универзитета у Калифорнији. Кобилка је почео са радом који је резултовао са серијом резултата који су дали детаљну слику унутрашње структуре рецептора и њиховог функционисања. Прича о структури почела је да се одвија касних деведесетих. Кристоф Палцевски (Krzysztof Palczewski) је био први који је добио кристале родопсина¹². Ово предствља велики допринос али је структура била релативно ниске резолуције и није могла нам открити детаље структуре GPCR. Ово је постао задатак истраживачког тима Кобилке. Успели су да дају представу о рецептору, што је за већину научне јавности био недостижан циљ, а за Кобилку је представљао дуг пут. Добити слику протеина је процес који подразумева много компликованих корака. Протеини су превише мали, да би се разликовали микроскопом. Метода избора је кристалографија X зрацима, за коју је неопходно продуктовати кристал, у коме су протеини распоређени на симетричан начин, попут молекула воде у кристалу леда или угљеника у дијаманту. И док су водорастворни протеини лаки за кристализацију, само неколико истраживача је успело добити слике протеина лоцираних у мембранама ћелија. Мембрански протеини се у води слабо растварају и формирају масне агрегате. Рецептори купловани са G протеинима су веома мобил-

ни по природи (они преносе сигнал захваљујући сопственој флексибилности), али унутар кристала морају остати скоро комплетно мирни. Добити их у кристалном облику је веома захтеван подухват. За решење ових проблема Кобилки је било потребно више од две деценије.

Последња декада почела је са првим кристалом 2007¹³ када је истраживачка група Кобилке обезбедила запањујући увид у детаље GPCR структуре. Добили су бета адренергички рецептор у неактивном стању. Овај пробој је био могућ захваљујући детаљној манипулацији, расуђивању и грешкама и истинском упорношћу (особина коју деле многи кристалографи). Кристалографија је још увек много више уметност него рационални пут у одређивању структуре одређеног протеина. Његов истраживачки тим пробао је са безброј комбинација, варијанти аминокиселинских секвенци протеина, са малим делецијама, заједно са неколико детергената, стабилизујући мале молекуле и протеине. Употреба антитела које је стабилизовало рецептор је била победничка комбинација. Друга структура је стабилизована везивањем бактериофага. Када су ови трикови коначно установљени, то је олакшало даљи рад. Још један пробој дошао је са структуром рецептора у активном стању, у стању за које се сматрало да је нестабилно за изоловање. Ово поређење између структура активног и неактивног стања пружила су информације о активационом процесу, укључујући идентитет специфичних хеликса који се крећу и утичу на везивање G протеина. Захваљујући својој посвећености, креативности и практичном знању молекуларне биологије су коначно 2011. публиковали структуру GPCR везаног за G протеин. Ова структура је преседан, будући да приказује разумевање функције рецептора на атомском нивоу укључујући покрете круцијалних хеликса и петљи. Рад групе професора Кобилке је праћен пионирским радом групе Рејмонда Стивенса (Raymond Stevens) који су развили посебне технике за кристализацију GPCR. Сви ови пројекти су технички *tour de forces*, подразумевајући тестирање хиљаду услова, огроман број сати ручног рада и деликатно руковање са природом протеина. Ове две лабораторије заједно представљају врх данашњих светских дестинација за кристалографију.

GPCR - ВАЖНИ ФАРМАКОЛОШКИ ТАРГЕТИ

Многи мали молекули служе као агонисти, инверзни агонисти и антагонисти који модулирају ћелијску активност везивањем за GPCR на различит начин. Везивањем агониста се стабилизује конформација рецептора а G протеин се активира. Инверзни антагонист се везује за неактивну форму, док се антагонисти или инхибитори везују за везујуће место агониста и последично блокирају њима изазване ефекте. GPCR представља модулаторни систем, у коме исти рецептор може да сигнализира кроз различите интраћелијске путеве зависно од везаног лиганда. Ово је могуће захваљујући релативној флексибилности рецептора у

мембрани, који обезбеђује стабилизацију активне или неактивне форме различитим агонистима односно инверзним агонистима. Лефковиц и сарадници пронашли су G протеин независне путеве у којима седамтрансмембрански протеини преносе сигнале у ћелију посредством других протеина укључујући арестине¹⁴. Стога „7ТМ“ више него „GPCR“ постаје адекватнији назив за ову класу рецептора. Сигнални пут бива селектован на бази идентитета лиганда, а исти 7ТМ може бити укључен у G протеинима посредоване односно G протеин независне путеве сигналинга. Детаљно проучавање овог феномена и његове основаности на структурном нивоу умногоме ће допринети развоју лекова за таргетивање датих рецептора. Тернарни комплекс и широк опсег различитих структура, обезбеђују базу за развој фармаколошких лекова са високом специфичношћу, ефикасношћу и малим споредним ефектима. Биохемијска стратегија коју је развио Кобилка, омогућила је кристализовање и других рецептора. Ове технике су већ усвојене у циљу продуковања кристала велике резолуције за бројне фармаколошки важне рецепторе. Важност овога свакако потврђује, Нобелова награда за физиологију и медицину 1988, за откриће пропранолола и циметидина, инхибитора βАР иХ2 хистаминског рецептора.

ЗАКЉУЧАК

Најважније, као и у свим другим великим открићима, рад Кобилке и Лефковица поставио је много питања што указује на узбудљиве, неистражене територије. Најзначајније откриће у овом контексту је да два слична молекула – два агониста – могу активирати протеине на другачији начин, доводећи до потпуно различитих физиолошких одговора, такозваног феномена: “функционална селективност”. Ово проистиче из диференцијалне интеракције GPCR са G протеинима, арестинима и другим протеинима у ћелији. Изузетно, функционална селективност може довести до истог молекуларног догађаја, зависно од физиолошког одговора који је посредован протеинима. Зато је функционисање GPCR попут Бахове симфоније Природе, више сет независних нота где комбинација интеракција радије него везивање појединачног одговора резултује комплексним физиолошким одговором. Рад овогднешњих Нобеловаца, отворио је врата разумевању како се ова симфонија спроводи.

У историји додељивања Нобелове награде до сада су забележени бројни случајеви да су Нобелову награду за медицину добили хемичари, ово је по нашем сазнању први пут да су лекари добили Нобелову награду за хемију. Структура елемената регулације метаболизма и спознаја њихове функције да би се ускладио животни циклус организма са променама у спољној средини су исходниште хемије, важан циљ биохемије и увод у даљи развој примењених дисциплине као што су медицина, ветерина, пољопривреда и фармација. У овом случају значај различитих ефеката које адреналин има у ткивима иницирао је интерес лекара за структуру посредника у преносу сигнала. То су успешно решили применом

класичних хемијских и биохемских метода (кристалографија) и у спрези са резултатима молекуларне биологије (хумани геном) што потврђује неопходност интердисциплинарних истраживања.

РЕФЕРЕНЦЕ

1. THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2012. THE ROYAL SWEDISH ACADEMY OF SCIENCES. [HTTP://KVA.SE](http://kva.se) 1-7.
2. David R. Jones, Duško P. Blagojević, Mihajlo B. Spasić: Uvod u molekularnu fiziologiju (Biohemija III). Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd 2006.
3. Neer, E.J. (1995). Cell 80, 249–57.
4. Gautam, N., Downes, G.B., Yan, K., Kisselev O. (1998). Cell Signal. 10, 447–455.
5. Lefkowitz, R.J. (1993). Cell 74, 409–412.
6. Hall, R.A., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (1999). J. Cell. Biol. 145, 927–932.
7. Schoneberg, T., Schultz, G. and Guderhann, T. (1999). Mol. Cell. Endocrinol 151, 181–193.
8. Lefkowitz R.J., Rajagopal K., Whalen E. J. (2006). Mol. Cell. 24, 643–652.
9. Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. (2002). J. Cell Sci.115, 455–465.
10. Dixon, R.A., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennet, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D. (1986). Nature 321, 75-79.
11. Rasmussen, S.G., Choi, H.J., Fung, J.J., Pardon, E.P., Casarosa, P., Chae, P.S., Devree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R.K., Gellman, S.H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W.I., Kobilka, B.K. (2011) Nature 469, 175-180.
12. Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Trong, I. L., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E. et al. (2000). Science 289, 739-745.

13. Rasmussen, S.G.F., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M.m Rratnala, V.R.P, Sanishvili, R., Fischetti, R.F., Schertler, G.F.X., Weis, W.I., Kobilka, B.K. (2007). Nature 450, 383 – 387.
14. Wei, H., Ahn, S., Shenoy, S.K., Karnik, S.S., Hunyady, L., Luttrell, L.M., Lefkowitz, R.J. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100, 10782-10787.

Abstract

THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2011. FOR STUDIES OF G – PROTEIN COUPLED RECEPTORS

Ana MIJUŠKOVIĆ, Mihajlo B. SPASIĆ

Institute for Biological Research “Siniša Stanković”, University of Belgrade.

Two American scientists Robert J. Lefkowitz and Brian K. Kobilka won the 2012 Nobel Prize in Chemistry. They were awarded "for groundbreaking discoveries that reveal the inner workings of an important family of such receptors: G-protein-coupled receptors," said the academy in a statement, adding that the studies by Lefkowitz and Kobilka are crucial for understanding how G-protein-coupled receptors function. Fine-tuned communication between individual cells is a prerequisite for maintaining homeostasis within a living organism. Cells have the ability to process amounts of information conveyed to them by extracellular About a thousand genes code for such receptors, for example, for light, flavor, odor, adrenalin, dopamine and serotonin and about half of all medications achieve their effect through GPCRs. Unfortunately for a long time, it wasn't possible to study the detailed structure of GPCRs because of the great difficulties in crystallizing them. This Nobel Prize continues the proud tradition of recognizing crystallographers who are among the most persistent and fearless of all scientists.



др Милена ЧАВИЋ, Институт за онкологију и радиологију Србије, Пастерова 14, 11000 Београд, Србија (milena.cavic@ncrc.ac.rs)

УЛОГА ЂЕЛИЈСКОГ СТАРЕЊА У РАЗВОЈУ И ТЕРАПИЈИ МАЛИГНИХ ОБОЉЕЊА

Старење (сенесценција) се дефинише као скуп свих промена и процеса у последњој фази животног циклуса и сматра се једним од најважнијих механизма који спречавају неконтролисану деобу ћелија. Најважнији фактори који узрокују физиолошко старење ћелије нераскидиво су повезани са развојем тумора и у њих се убрајају скраћивање теломера, тумор супресори, онкогени, механизми исправке оштећења ДНК, реактивне кисеоничне врсте, глукоза, протеини цитотоксичног шока итд. Старење ћелије има двојну улогу у туморигенези, заштитну и промотивну. С обзиром на то да туморске ћелије често развијају резистенцију на стандардни вид терапије која индукује апоптозу, алтернативни приступи индукције старења иако да ћелија претстане

да се дели се показао успешним у лечењу неких типова тумора.

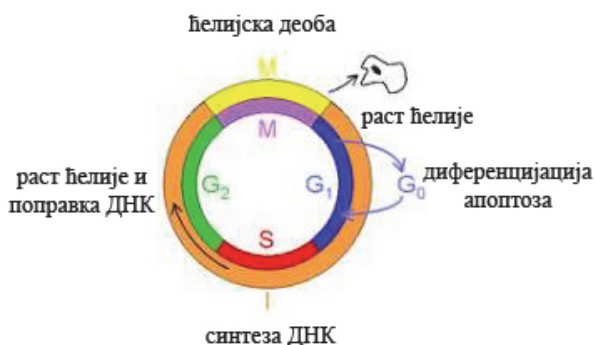
УВОД

Старење (сенесценција) се дефинише као скуп свих промена и процеса у последњој фази животног циклуса и сматра се једним од најважнијих механизма који спречавају неконтролисану деобу (пролиферацију) ћелија. Примарно старење је условљено генетским, непроменљивим факторима који зависе од саме врсте, док је секундарно старење резултат бројних фактора околне средине.

Ђелијско старење је први пут описано као стање престанка раста фибробласта^{а)} у култури, касније и

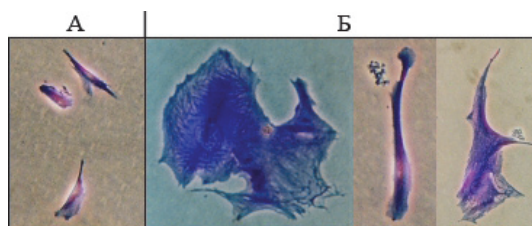
^{а)} Фибробласти су најзаступљеније ћелије везивног ткива које синтетишу ванћелијски матрикс и колаген, основне потпорне структуре животињских ткива.

других соматских ћелија, на крају њиховог животног века што је у контрасту са особинама репродуктивних, матичних и туморских ћелија [1]. Главне особине сенесцентних ћелија су ирверзибилан престанак раста, резистенција на апоптотске сигнале и промена функције и интегритета ћелије [2]. Сенесцентне ћелије су зауостављене у G_1/G_0 фази ћелијског циклуса^{a)} и не могу се поново увести у репликативни циклус.



Слика 1. Схематски приказ фаза ћелијског циклуса.

Сенесцентне ћелије су мање осетљиве на сигнале који доводе до програмиране ћелијске смрти (апоптозе) од нормалних ћелија, што их уједно добро диференцира и од умирућих ћелија. Такође, сенесцентне ћелије су веће од пролиферишућих, расту у мањој густини у култури и карактерише их више морфолошких типова. Промена изгледа се јавља услед бројних физиолошких процеса као што је стварање неправилног једра услед реорганизације хроматина, оштећење ДНК митохондрија реактивним кисеоничним врстама, смањење функције ендоплазматичног ретикулума и Голџијевог апарата и смањена синтеза протеина, липидна пероксидација и хидролиза остарелих органела у секундарним лизозомима уз нагомиланање браонкастог пигмента липофусцина у резидуалним телашцима итд.



Слика 2. (А) Изглед хуманих фибробласта у култури. (Б) Фибробласти у процесу ћелијског старења.

Експресија неких протеина значајно се повећава у сенесцентним ћелијама, па се они често називају биомаркерима старења ћелије. То су нпр. осетонектин, фибронектин, аполипопротеин Ј (ванћелијски шаперон),

проколаген типа 2, металопротеиназе ванћелијског матрикса итд. Други протеини мењају своју активност, па је тако познато да ензим β -галактозидаза, који је лизозомална хидролаза, код сенесцентних ћелија ради на другом рН оптимуму [3].

Разне теорије старења се баве идентификацијом узрока старења и објашњавањем самог процеса и његових последица [4]. **Еволуционе теорије** сматрају да еволуција максимизује репродуктивну моћ јединке, тако да је дужина живота подређена способности јединке за репродукцију, а старење последица нестајања силе природне селекције. **Системске теорије** повезују процес старења са поремећајем функционисања неуроендокриног и имуног система, који контролишу, одржавају и омогућавају комуникацију свих осталих система органа, као и адаптацију на спољашње стимулусе. **Молекуларне теорије** разматрају да је узрок старења промена експресије гена и оштећење ДНК, што мења профил протеина које ћелије луче у своју околину. **Ћелијске теорије** проучавају утицај стреса, слободних радикала и теломера на веродостојност репликације при деоби ћелија, односно на број мутација који се нагомилала у ДНК у времену.

БИОХЕМИЈСКИ МЕХАНИЗМИ СТАРЕЊА ЋЕЛИЈЕ И РАЗВОЈА ТУМОРА

Најважнији фактори који узрокују физиолошко старење ћелије нераскидиво су повезани са развојем тумора. Борба против ових фактора је врло тешка је су многи од тих молекула и механизма исти они који здраву ћелију одржавају у животу, омогућавају њен раст и деобу (кисеоник, хормони, ензими, фактори раста, сигнални молекули, транскрипциони фактори, глукоза, липиди) [5].

У најважније механизме који узрокују старење и развој тумора укључени су следећи фактори:

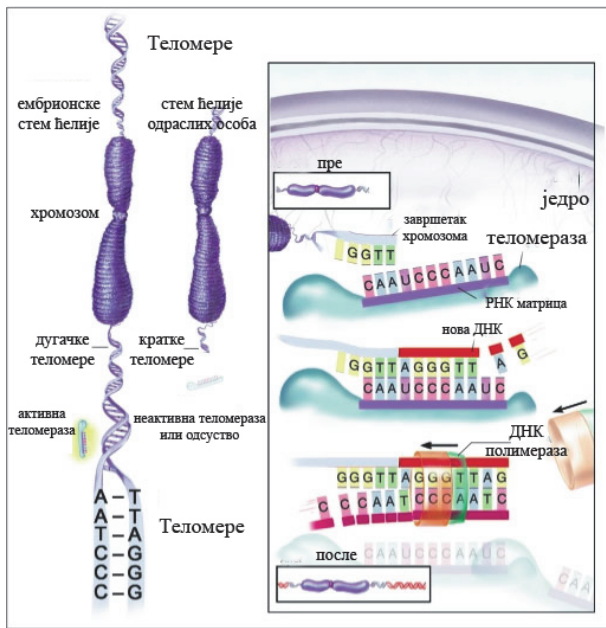
• скраћивање теломера

На крајевима сваког хромозома налазе се дуги поновци ТТАГТТ секвенце нуклеотида, који се зову теломере. Након сваке деобе, теломере се скраћују, приближно за осам ових секвенци, услед несавршености механизма репликације на крајевима линеарних еукариотских хромозома^{b)} [6].

Теломере служе као заштита да се при репликацији не губе кодирајући делови хромозома. Такође физички праве петље које штите крајеве хромозома од разградње механизмима који препознају поломљене хромозоме. Ензим теломеразе, РНК зависна ДНК полимеразе, стално надокнађује губитак теломера. Ниво експресије теломеразе је висок код репродуктивних, матичних и туморских ћелија, док је код соматских ћелија једва присутан, па ове ћелије подлежу старењу.

^{a)} Ћелијски циклус представља период живота ћелије између две деобе, при чему је једна деоба укључена у циклус. Састоји се од фазе деобе ћелије и интерфазе у току које се ћелија припрема за деобу и која обухвата пресинтетичку (G_1), синтетичку (С) и постсинтетичку (G_2) фазу.

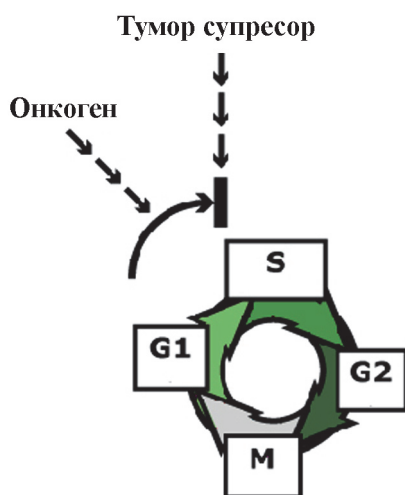
^{b)} Репликација ДНК почиње на средини ДНК ланца и ДНК полимераза напредује у $5' \rightarrow 3'$ смеру, тако да се стварају тзв. „водећи“ (*leading strand*) и „заостајући“ (*lagging strand*) ланца. Приликом стварања водећег ланца нема проблема при репликацији. На заостајућем ланцу, кратке РНК матрице помажу полимеразу да напредује при чему се стварају тзв. Оказакијеви фрагменти који се онда спајају. До проблема долази при спајању последња два фрагмента на крају хромозома (у оквиру теломера) што доводи до скраћивања хромозома за последњи део секвенце.



Слика 3. Приказ положаја теломера на крајевима хромозома и функције теломеразе.

Након низа деоба ћелије, пре потпуног губитка теломера, код нормалних соматских ћелија се активира сигнална каскада која укључује p53 и Rb протеине и долази до застоја ћелијског циклуса у G₁ фази па су даље деобе немогуће. Евенгуално даља деоба уводи ћелију у кризу, геномску нестабилност и апоптозу. Ипак, један мали број ћелија може да избегне апоптозу услед повећане експресије теломеразе или индукције алтернативних путева за продужавање теломера^{a)} [7]. Овим ћелије добијају скоро неограничен потенцијал за деобу што може да доведе до стварање тумора.

• Тумор супресори



Слика 4. Схематски приказ функције тумор супресора и онкогена у ћелијском циклусу.

^{a)} Алтернативно продужавање теломера се може одвијати помоћу ванхромозомских теломерних секвенци које служе као матрица, репликацијом након оштећења, продужавањем т-петљи на крајевима хромозома, „rolling circle“ репликацијом итд.

Тумор супресори имају функцију да спрече неконтролисано деобу ћелија или њихову интеракцију са ванћелијском околином и миграцију из матичног ткива. Ови протеини доводе до прекида деобе ћелије која је на неки начин оштећена, индукују механизме за поправку оштећења ДНК или уводе ћелију у апоптозу уколико је оштећење превелико. Ови механизми су неопходни за процесе физиолошког старења ћелије, када је неопходно елиминисати ћелије које су услед старења временом накупиле превише оштећења.

Код туморских ћелија су гени који кодирају тумор супресоре врло често мутирани. Ово доводи до производње протеина који не могу да се вежу за ДНК и испоље своју заштитну функцију, па оштећена ћелија наставља деобу. Неки од најпознатијих тумор супресора су p53, Rb, p16, PTEN, APC, INK4A, MLH1, MSH2, NF1 итд.

• Онкогени

Протоонкогени кодирају протеине укључене у контролу сигналних путева ћелије, као што су фактори раста, њихови рецептори, сигнални молекули, ензими, транскрипциони фактори итд. Када дође до мутације или прекомерне експресије ових гена, настају тзв. онкогени, који узрокују неконтролисан раст и деобу ћелија и у одсуству одговарајућих сигнала (тзв. конститутивна активност). Активација онкогена може да доведе до индукције прераног старења ћелије и престанка раста и деобе измењених ћелија, као један од антигуморских заштитних механизма [8]. У неким случајевима, када у ћелији мутира више онкогена оједном, деоба и раст ћелија помоћу више независних механизма доводи до развоја тумора. Неки од најпознатијих онкогена су abl, akt, bcr-abl, bcl-2c-мус, egfr, her-2, ras, raf, src, EBV, HPV.

• Механизми поправке оштећења ДНК

Ћелија има разне ензиме који адекватно поправљају разне типове оштећења ДНК, а укључени су у процесе фотореактивације, трансфера метил група, исецања база, исецања нуклеотида, спаривања лоше упарених нуклеотида, поправке дволанчаних прекида, нехомолог спајања крајева, хомологе рекомбинације итд. Потенцијал ових механизма опада са старашћу једне ћелије, а мутације у генима за поправку ДНК могу да доведу до старење ћелије, апоптозе или развоја тумора.

Урођене мутације у генима за поправку оштећења ДНК су повезане са ризиком за развој тумора. Можда најпознатији пример је повезаност мутације у BRCA1/2 генима (који учествују у хомолој рекомбинацији и нехомологом спајању крајева) са ризиком од појаве карцинома дојке.

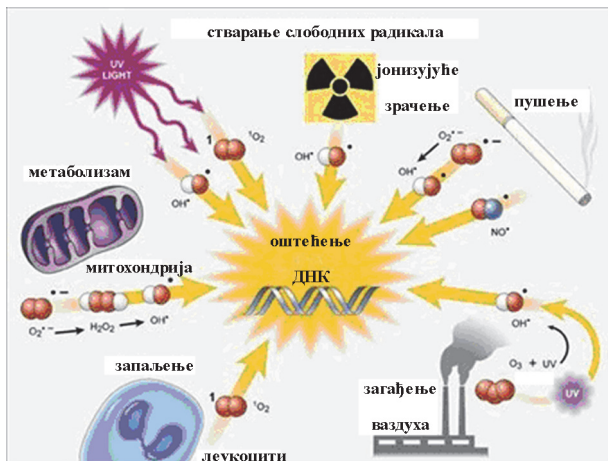
Табела 1. Преглед најчешћих типова оштећења ДНК

Тип оштећења	догађај/ћелији/дану	% укупног дневног оштећења
Једноланчани прекиди	120,000	50,9

N ⁷ -метилгуанин	84,000	35,6
Депуринација	24,000	10,2
O ⁶ -метилгуанин	3,120	1,3
Оксидација ДНК	2,880	1,2
Депиримидинација	1,320	0,5
Деаминација цитозина	360	0,2
Дволанчани прекиди	9	0,01
Интерланчана унакрсна повезивања	8	0,01

• Реактивне кисеоничне врсте

Реактивне кисеоничне врсте као што су пероксид, супероксид анјон радикал, хидрокси радикал, настају као последица аеробног начина живота и потичу из средине (УВ и јонизујуће зрачење, пушење, загађење ваздуха, тешки метали, токсини) и из метаболичке активности саме ћелије. Назив су добиле услед високе нестабилности и потенцијала за оштећивање протеина и нуклеинских киселина које нападају у циљу стабилизације сопствене структуре. Осим оштећења биомолекула, у овом процесу настају и нове реактивне кисеоничне врсте, па је овај ланчани процес тешко зауставити.



Слика 5. Начини настанка реактивних кисеоничних врста у ћелији.

У здравој ћелији постоје ефикасни ензимски (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза) и неензимски (витамици Ц, Е, бета каротен) механизми који не дозвољавају да ови молекули направе велика оштећења са високом вероватноћом. Ипак, временом се оштећења нагомилавају што доводи до старења ћелије, али и до формирања тумора. Туморске ћелије имају висок ниво реактивних кисеоничних врста услед повећане метаболичке активности и поремећеног рада митохондрија, што узрокује још већу генетску нестабилност ћелије. Нове мутације и неадекватан рад митохондрија често доводе и до отпорности туморских ћелија на лекове. Респираторни ланац митохондрија је велики извор реактивних кисеоничних врста, па је митохондријска ДНК нарочито осетљива на оштећења што се може искористити као селективни механизам за убијање туморских ћелија.

• Глукоза

Повишен ниво глукозе у крви може довести до неензимске гликозилације протеина, која води ка низу хемијских реакција и као крајњи продукт се добијају умрежени протеини (тзв. AGE продукти - *Advanced Glycation End products*). Овај процес је спор, али се прогресивно убрзава са старењем ћелије и временом мења структуру и улогу многих протеина.



Слика 6. Приказ неензимске гликозилације протеина при условима повишеног нивоа глукозе у крви.

Организам се против AGE продуката брани макрофагима који имају рецепторе за њих, фагоцитују их, обраде и омогућавају изbacивање урином. Са старењем расте концентрација AGE продуката и због умањене функције имуног и уринарног система. Ослобађање AGE продуката након смрти ћелије изазива оксидативни стрес у околним ћелијама које имају рецепторе за њих, а пронађено је и да AGE продукти стимулишу раст и миграцију већ насталих туморских ћелија за сада још увек недовољно истраженим механизмима. Туморске ћелије се карактеришу повећаним уносом глукозе услед бржег метаболизма, па је код њих виши и ниво AGE продуката [9].

• Протеини топлотног шока (шаперони)

Без обзира на назив, ови протеини се синтетишу у већој количини када је ћелија изложена разним врстама стреса, јер помажу процесе увијања нових протеина у нативну конформацију и процесе уништавања старих и оштећених протеина. Ниво њихове експресије опада са старењем ћелије. Код многих тумора, ниво експресије ових протеина је висок, што је повезано са лошом прогнозом и резистенцијом на терапију [10]. Ово сазнање је искоришћено за дизајн инхибитора шаперона са циљем да се туморске ћелије уведу у старење и касније у апоптозу.

УЛОГА СТАРЕЊА ЋЕЛИЈЕ У РАЗВОЈУ МАЛИГНИХ ОБОЉЕЊА

Механизми старења, апоптозе и развоја канцера су нераскидиво повезани. Старење ћелије има двојну улогу у туморигенези, заштитину и промотивну [11]. У највећем броју случајева разне врсте стреса, активација онкогена, инактивација тумор супресора и зрачење доводе до превременог старења ћелије и у здравим и у туморским ћелијама, па се старење ћелије сматра физиолошким заштитним механизмом који мора да се превазиђе да би ћелија могла неконтролисано да се дели.

Поред заштитне улоге, старењем се у ћелији нагомилавају оштећени биомолекули и опада моћ репарационих механизма што олакшава развој тумора. Такође, сенесцентне ћелије своју микрооколину чине и погодном за развој тумора лучењем проинфламаторних цитокина, протеаза и фактора раста у циљу привлачења ћелија имуног система које ће их укони и иницијацијом деобе околних ћелија које ће заузети њихово место након уклањања [12]. Код млађих особа овај механизам добро функционише, али код старијих може да доведе до развоја тумора услед умањене функције ћелија имуног система и смањеног потенцијала матичних ћелија за деобу.

АНТИТУМОРСКА ТЕРАПИЈА ЗАСНОВАНА НА ИНДУКЦИЈИ СТАРЕЊА ЋЕЛИЈЕ

Тумори садрже ћелије које имају продужени животни век или оне које су имортализоване. Током развоја тумора постоји јака селекција ћелија са повећаним потенцијалом за деобу, при чему се повећава вероватноћа за вишеструке мутације које доводе до малигнитета. Циљ анти туморских терапија је најчешће да се ћелија уведе у програмирану ћелијску смрт (апоптозу). С обзиром на то да туморске ћелије често развијају резистенцију на овај тип терапије, алтернативни приступ индукције старења се показао успешним у лечењу неких типова тумора (хепатоцелуларног карцинома, лимфома, остеосаркома) [13,14]. Неки од тренутних приступа су засновани на инхибицији активности теломеразе, инактивацији онкогена, реактивацији тумор супресора, оштећењу ДНК у мери која превазилази потенцијал механизма поправке, инхибицији експресије шаперона, инхибицији везивања глико-умрежених протеина за рецепторе, оштећењу митохондријске ДНК реактивним кисеоничним врстама итд. Проблем са овим типовима терапија је у томе што је тешко индуковати старење само код туморских ћелија. Третманом се редукује потенцијал за деобу и здравих и матичних ћелија, што смањује способност ткива да се регенирише након терапије и може да доведе до токсичности. Неопходан је развој даљих стратегија за циљано физичко или биохемијско достављање терапеутика који изазивају превремено старење само до туморских ћелија.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hayflick L, Moorhead P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961, 25(3):585–621.
2. Campisi J. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo.* 2000, 14(1):183–8.
3. Dimri G.P, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:9363–67.
4. Weinert B.T, Timiras P.S. Physiology of aging. Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol.* 2003, 95:1706–16.
5. Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H. Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res.* 2011, doi: 10.4061/2011/963172
6. Harley C, Futcher A, Greider C. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990, 345(6274):458–60.
7. Henson J, Neumann A, Yeager T, Reddel R. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene.* 2002, 21(4):598–610.
8. Serrano M, Lin A, McCurrach M, Beach D, Lowe S. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 1997, 88(5):593–602.
9. Takino J, Yamagishi S, Takeuchi M. Cancer malignancy is enhanced by glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products. *J Oncol.* 2010;2010:739852. Epub 2010 Jun 29.
10. Calderwood S, Khaleque M, Sawyer D, Ciocca D. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006, 31(3):164–72.
11. Chuaire-Noack L, Sánchez-Corredor M, Ramírez-Clavijo S. The dual role of senescence in tumorigenesis. *Int J Morphol.* 2010, 28(1):37–50.
12. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011, 192(4):547–56.
13. Leonart ME, Artero-Castro A, Kondoh H. Senescence induction; a possible cancer therapy. *Mol Cancer.* 2009, 8:3.
14. Saretzki G. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* 2010, 16(1):79–100.

Abstract

THE ROLE OF CELLULAR AGING IN THE DEVELOPMENT AND TREATMENT OF MALIGNANT DISEASES

Milena ČAVIĆ, PhD, Department of Experimental Oncology, Institute for Oncology and Radiology of Serbia, (milena.cavic@ncrc.ac.rs)

Aging (senescence) is the sum of all changes and processes that occur in the final stage of any life cycle. It is considered as one of the most important mechanisms for the prevention of uncontrolled proliferation of cells. The most important factors which induce cellular aging are the same ones involved in cancer development: shortening of the telomeres, tumor suppressors, oncogenes, DNA repair mechanisms, reactive oxygen species, glucose, heat-shock proteins etc. Cellular aging has a dual role in tumorigenesis, protective and promotional. Cancer cells often develop resistance to the standard apoptosis-inducing therapy. The alternative approach of inducing cellular senescence thus inhibiting the cell's ability to proliferate has proven effective in the treatment of some types of tumors.



Романа МАСНИКОСА, Институт за примену нуклеарне енергије, Универзитет у Београду, Банатска 31б, Београд, Србија (romana@iner.co.rs)

ТЕХНИКЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ СТРУКТУРЕ ГЛИКАНА

ИЗВОД

У овом раду су објашњени различити ириситији одређивању структуре Н-гликана везаних за протеине. Описане су специфичне хемијске, ензимске и друге аналитичке технике, као и технике масене спектрометрије, које се користе за одређивање примарне структуре гликана. Када је у питању ивичан сисарски гликопротеин, одређивање структуре неког од његових гликана се углавном своди на коректан избор одређене структуре из база података које садрже све досада познате структуре гликана. Ако се ради о гликану из бактерије или неког организма који је мало ивичиван, иешко је предвидети његову структуру, ие се она одређује без иочейних ирејисавки каква структура је у иичању. Избор иехнике и методе за одређивање структуре гликана зависи од иоја колико материјала имамо на раслоању, која му је ииса и из кој извора ииче (нпр. узорци икива или ћелије у култури). Ако материјала има довољно, може се одредити примарна структура гликана у иом узорку. Чешће је случај да узорка нема довољно или да узорак није довољно иречишен, ие се иридеја делимичној карактеризацији гликана у узорку. Како ииредује иехнологија, иако се иовећава и осетљивост метода за одређивање структуре гликана.

КАКО СЕ ОДЛУЧИТИ ИЗМЕЂУ ХПЛЦ И МС (ПОД УСЛОВОМ ДА ИМАМО ОБА ИНСТРУМЕНТА)?

Пре него што се упустимо у детаљнији опис ове две методе, изнећемо упоредни приказ њихових основних предности и мана. ХПЛЦ се брже изводи од МС. МС је осетљивија од ХПЛЦ те се примењује када се располаже малом количином узорка (или малом концентрацијом одређеног гликана у смеши). МС има далеко већу моћ раздвајања и ради и када су у питању смеше које садрже велики број различитих гликана. Даље, могуће је спрегнути две МС у тзв. тандем МС. МС је деструктивна метода (узорак који је прошао МС се не може употребити касније за неку другу анализу), док ХПЛЦ то није. За МС није нужно обележавање гликана, док за ХПЛЦ углавном јесте, али зато детектор на излазу из ХПЛЦ детектује само обележене гликане. Пре МС је неопходна приметна процедура пречишћавања протеина, отклањања трагова соли, детерџента итд. што је тешко извести када се располаже малим количинама гликопротеина. Масени спектрометар је веома скуп инструмент. МС не може раздвојити регио- и стереоизомерне структуре гликана, јер имају исту масу, док ХПЛЦ то може. У тексту који следи ће детаљније ни гликани се не везују за јоноизмењивач, те излазе већ

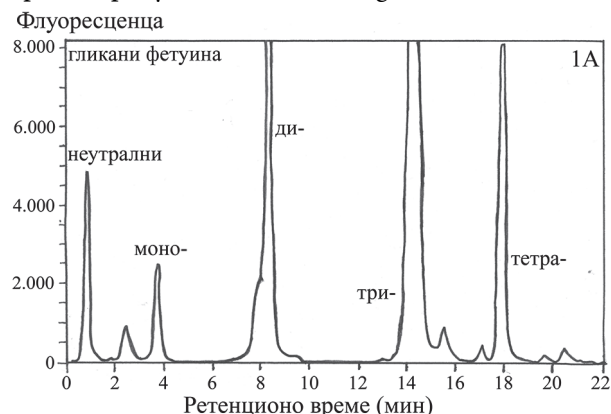
бити објашњени принципи на којима почивају поменуте методе.

ПРИМЕНА ХПЛЦ У АНАЛИЗИ ГЛИКАНА

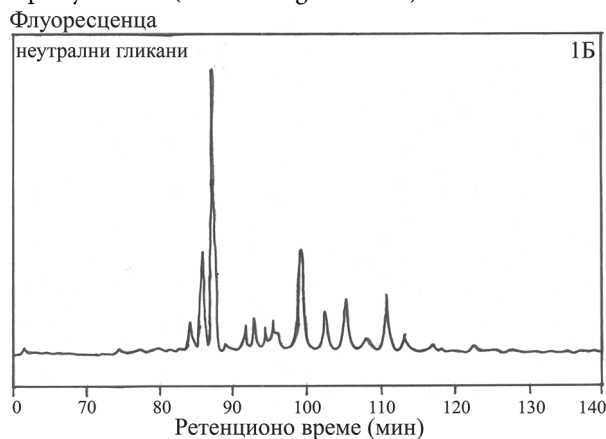
Ова метода се веома често користи за профилисање гликана из једног гликопротеина, из смеше гликопротеина или из комплексног биолошког узорка као што је серум или ћелијски лизат. У литератури је описано мноштво различитих верзија раздвајања гликана на ХПЛЦ колонама, које се разликују у избору флуорофоре, у природи непокретне фазе у самој колони (хроматографски матрикс) у природи течне фазе итд. Пре анализе потребно је: имати одређену минималну концентрацију гликопротеин(а) у узорку (да се уђе у опсег детекције методе), да се гликани ослободе од протеина и да се преведу у посебан раствор и да се обележе. Постоји једна техника за профилисање гликана у нативном облику, без претходног обележавања, ајоноизмењивачка хроматографија при високом рН са пулсном амперометријском детекцијом (high pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detector, ХПАЕЦ-ПАД).

ХПЛЦ омогућава раздвајање смеше гликана на компоненте на основу разлике у величини, наелектрисању, врсти гликозидне везе и свеукупној структури. За раздвајање флуоресцентно обележених гликана на сијало и неутралне Н- и О-гликане користе се три типа ХПЛЦ: нормално-фазна (НП-ХПЛЦ), реверзно-фазна (РП-ХПЛЦ) и јоноизмењивачка хроматографија (ИЕ-ХПЛЦ). При НП-ХПЛЦ као матрикс у колони се користи силан са имидним или амидним функционалним групама. На колону се наноси узорак у раствору органског ратварача, а потом елуира раствором у коме се постепено повећава удео водене фазе. На овај начин гликани се раздвајају на основу финих разлика у хидрофилности, то јест на основу разлика у њиховом афинитету за матрикс. Сијало и неутрални гликани се раздвајају у истом експерименту. Хроматографијом на бази слабог ајонског јоноизмењивача се могу раздвојити Н- од О-гликана, јер имају различит број негативно наелектрисаних група. Ретенционо време једног гликана ће бити одређено садржајем Sia, сулфатних и фосфатних група, и, у мањој мери, његовом величином. На слици 1 је приказано раздвајање гликана из фетуина (гликопротеин) на неутралне, моно-, ди-, три- и тетра-сијало гликане. Са слике се види да се са колоне прво елуирају моно-сијало гликани, то јест најкраће се задржавају на ајонском измењивачу. Тетра-сијало гликани (имају 4 негативно наелектрисања по молекулу гликана) се најдуже задржавају на колони. Неутрал-

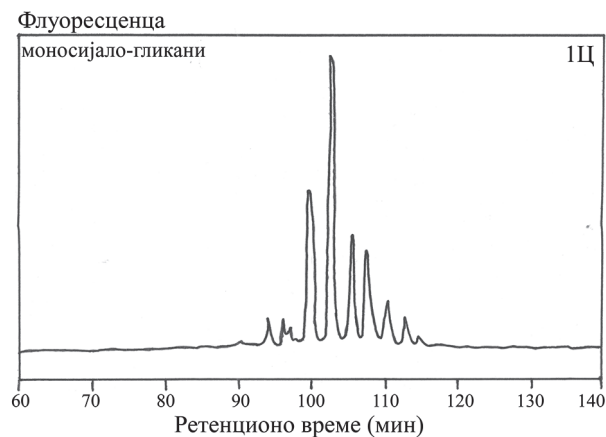
при испирању колоне (flow-through fraction).



Слика 1. Раздвајање неутралних и киселих гликана из фетуина ХПЛЦ методом на колони слабог јоноизмењивача. **А)** Раздвајање смеше гликана на неутралне, моно-, ди-, три- и тетра-сијало гликане. Са колоне прво силасе моно-сијало гликани, јер се најкраће задржавају на анјонском измењивачу. Тетра-сијало гликани (имају 4 негативна наелектрисања по молекулу гликана) се најдуже задржавају на колони. Неутрални гликани се не везују за јоноизмењивач, те излазе већ при испирању колоне (flow-through fraction).



Б) Даље раздвајање фракције неутралних гликана са слике А) НП-ХПЛЦ методом.



Ц) Даље раздвајање фракције моно-сијало гликана са слике А) НП-ХПЛЦ методом [1].

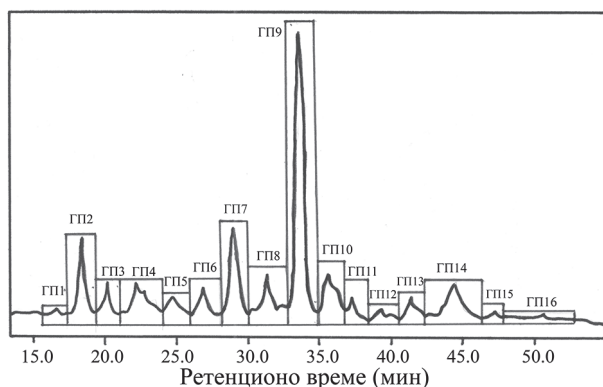
При РП-ХПЛЦ гликани се раздвајају на основу разлике у њиховој хидрофобности. Најчешћи матрикс који се користи је јако неполарни Ц18 (октадецил-силан, ОДС). На колону се наноси узорак растворен у воденом пуферу, а потом елуира раствором у коме се постепено повећава удео органског растварача. Овај систем је комплементаран НП-ХПЛЦ, те није реткост да се неки гликани који излазе у једном пику при РП-ХПЛЦ раздвоје при НП-ХПЛЦ и обрнуто. У пракси се сваки од пикова добијених једном врстом ХПЛЦ анализира бар још једном ХПЛЦ анализом (Слика 1Б и 1Ц).

Типично профилисање Н-гликана везаних за протеине из хумане плазме би изгледало овако: Н-гликани се ослободе из протеина плазме дејством ензима пептидна Н-гликозидаза Ф (ПНГ-аза Ф), потом се флуоресцентно обележавају у реакцији са 2-аминобензамидом (2-АБ) те се смеша подвргава ХПЛЦ анализи која се заснива на хидрофилној интеракцији гликана са непокретном фазом (ХИЛИЦ). Као непокретна фаза користи се поларни матрикс на бази амидног гела, а као покретна фаза органски растварач који не даје протоне и који је мешљив са водом (ацетонитрил). Механизам раздвајања гликана није у детаље расветљен, али се сматра да се на површини поларне непокретне фазе образује слој богат водом, насупротив покретној фази лишеној воде, чиме се ствара један специфичан течнотечни систем за екстракцију [2]. Смеша 2-АБ деривата гликана се раздељује између ова два слоја. Типичан хроматограм добијен овом методом приказан је на слици 2.

На слици 2 се уочава 16 хроматографских пикова (ГП1, ГП2...), а сваки пик је у ствари смеша гликана сличне структуре. Први пик садржи два гликана (А2 и А2В), други пик такође садржи два гликана (А1Г1 и FA2), трећи пик садржи 4 гликана (M5, FA2B, A2[6]G1, A2[6]BG1), четврти пик садржи 12 гликана (A2[3]G1, A2[3]BG1, M4A1G1, FA2[6]G1, FA2[6]BG1, A1[6]G1S(3)1, A1[6]G1S(6)1, FA2[3]G1, FA2[3]BG1, M6D1, D2, A1[3]G1S(3)1, A1[3]G1S(6)1), пети пик садржи 7 гликана (M6D3, A2[6]G1S(3)1, A2[6]G1S(6)1, A2G2, A2[3]G1S(3)1, A2[3]G1S(6)1, A2BG2), шести пик садржи 13 гликана (FA2[6]G1S(3)1, FA2[6]G1S(6)1, FA2[6]BG1S(3)1, FA2[6]BG1S(6)1, M4A1G1S1, FA2G2, FA2[3]G1S(3)1, FA2[3]G1S(6)1, A2BG1S1, FA2[3]BG1S(3)1, FA2[3]BG1S(6)1, FA2BG2, M7D3) итд.

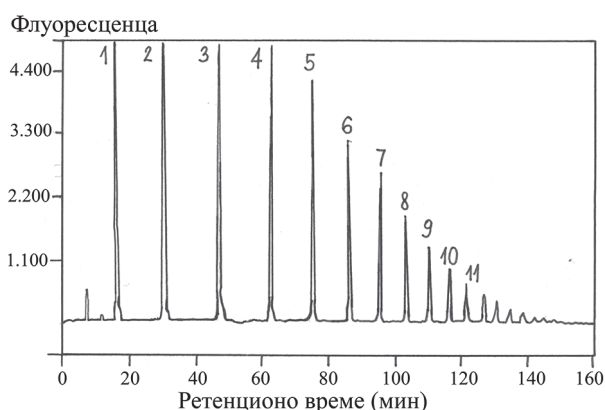
Језгро Н-гликана чине два остатка Н-ацетил-глюкозамина (GlcNAc). Ознака F на почетку скраћенице указује да је један остатак фукозе (L-Fuc) везан за GlcNAc у језгру гликана. Mx је број остатака манозе (Man) везаних за језгро. Ознака D1 значи да је α -1,2Man везана за Man α -1,6Man α -1,6 ручицу (arm), D2 значи да је α -1,2Man везана за Man α -1,3Man α -1,6 ручицу, D3 значи да је α -1,2Man везана за Man α -1,3 ручицу M6 гликана и за Man α -1,2Man α -1,3 ручицу M7 и M8 гликана. Ознака Ax је број (x) антена (GlcNAc) везаних за триманозно језгро: A2 је биантенарни гликан у коме су оба остатка GlcNAc везана β -1,2 везом. A3 је триантенарни гликан у коме су два остатка GlcNAc везана β -1,2 везом

за два остатка Man, а трећи GlcNAc је везан β -1,4 везом за α -1,3Man. A4 је тетраантенарни гликан у коме су три остатка GlcNAc везана као у A3 гликану, а четврти β -1,6 везом за α -1,6Man. Ознака B је за уметнути остаток GlcNAc везан β -1,4 везом за β -1,3Man. Gx је ознака за број (x) β -1,4 везаних остатака галактозе (Gal) на антенама. [3]G1 и [6]G1 означава да је Gal на антени α -1,3Man односно α -1,6 Man. Fx је број остатака (x) L-Fuc везаних α -1,3 везом за антенарни GlcNAc. Sx је број (x) остатака сијалинске киселине (Sia) везаних за Gal; бројеви 3 или 6 у заградама после S показују да ли је Sia везана α -2,3 или α -2,6 везом. Ако не пише ништа онда није познато каква је веза [2].



Слика 2. Хроматографски профил Н-гликана из узорка хумане плазме добијен ХПЛЦ-ХИЛИЦ техником [2].

Како се утврђује који је који гликан на хроматограму? Паралелно са узорцима, ХПЛЦ анализи се подвргавају и стандарди. То су хомополимери глукозе (Glc) различитих дужина ланца, обележени истом флуорофором као и гликани. Најчешће се користе 2-АБ-декстриани (dextran ladder), који имају стандардна и позната ретенциона времена (Слика 3).



Слика 3. Хроматографски профил делимично хидролизованог 2-АБ-декстрана добијен НП-ХПЛЦ техником. Бројеви изнад пикова показују Glc јединице (ГУ) [1].

Компјутерски програм упоређује измерена ретенциона времена испитиваних гликана са ретенционим

временима декстранских стандарда и изражава их у глицозним јединицама - ГУ [3]. Тако нпр. ако гликан има ретенционо време од 8.87 ГУ, то значи да се задржава на колони колико и гликан састављен од 8.87 остатака Glc. Измерене вредности ГУ се уносе у програм, а овај претражује одговарајуће базе података које садрже структуре свих познатих гликана. Тако на пример база по имену GlycoBase^a садржи ХПЛЦ ретенциона времена за преко 350 АБ-обележених Н-гликана заједно са предвиђеним производима дигестије ензимима егзогликозидазама (види наредни одељак). Програм ће из базе података извући све гликане са вредношћу ГУ која се подудара са вредношћу добијеном у експерименту. Веома је чест случај да постоји више од једне предложене структуре за сваки пик са ХПЛЦ.

Дејством различитих ензима егзогликозидаза могуће је од сваког гликана произвести јединствени комплет мањих гликана. И ови гликани су излистани у GlycoBase. Кад се гликан скраги за једну моносахаридну јединицу настаје мањи гликан, чија ГУ вредност опет постоји у бази. Тако на пример, ако се пик гликана помери за 1.6 ГУ након дигестије β -1,4 галактозидазом, значи да је гликан на редукујућем крају садржавао два остатка Gal везана β -1,4 гликозидном везом (један остаток Gal повећава вредност ГУ за 0.8). Обично се један исти узорак гликана излаже дејству различитих егзогликозидаза, појединачно и у комбинацији, те се ови хидролизати анализирају ХПЛЦ техником. База података пружа могућност да се у њу унесу сва измерена ретенциона времена (и за испитивани гликан и за фрагменте добијене његовом дигестијом) те се број гликана који се додељује сваком пиксу знатно смањује.

Идентификација гликана на основу ретенционих времена декстранских стандарда важи углавном за НП-ХПЛЦ. Код РП-ХПЛЦ, ретенциона времена гликана из испитиваног узорка се упоређују са ретенционим временима хомополимера арабинозе (arabinose ladder) и означавају се као арабинозне јединице (AU).

ОСВРТ НА ЕГЗОГЛИКОЗИДАЗЕ

Егзогликозидазе су ензими који одсецају крајње остатке моносахарида са гликана. Сијалидаза (или неураминидаза) пореклом из *Arthrobacter ureafaciens* или из *Clostridium perfringens* се користи за хидролизу α -2,3, α -2,6 или α -2,8 гликозидне везе између крајње Sia и претпоследњег остатка Gal. α -L-фукозидаза изолована из говеђег бубрега хидролизује α -1,6 гликозидну везу између L-Fuc у језгру гликана и GlcNAc. α -L-фукозидаза изолована из бадема хидролизује L-Fuc везану α -1,3 или α -1,4 гликозидном везом. Дејством β -1,4 галактозидазе из *Streptococcus pneumoniae* уклањају се остаци Gal, а дејством β -Н-ацетилхексозаминидазе из пасуља остаци GlcNAc. Ензим α -манозидаза из пасуља користи се за дигестију остатака Man везаних α -1,2, α -1,3 или α -1,6 гликозидном везом, а α -манозидаза из *Xanthomonas manihotis* специфична је за Man везану α -1,6 гликозидном везом.

^a) http://glycobase.nibr.ie/glycobase/show_nibr.action

МС

Пар речи у уводу за оне који нису код куће са МС. Ова техника се користи за одређивање масе молекула, састава смеша и за осветљавање хемијске структуре молекула. МС мери масу индивидуалних молекула тако што их прво претвара у јоне у вакууму (јонизација молекула), а потом мери интензитет промене њихових путања у електричном и магнетном пољу (или у комбинованом пољу ова два). О масама се закључује на основу односа масе и наелектрисања молекула (m/z). Молекулски јони се раздвајају у електричном и магнетном пољу анализатора на основу m/z вредности, а потом се детектују. Детектор мери релативну заступљеност сваког појединачног јона, а јонски сигнали се на крају виде као масени спектар.

Главни проблеми који су дуго ограничавали примену МС у структурној анализи протеина били су тешкоће превођења протеина у гасно стање и термолабилност. Проналазак метода „меке” јонизације омогућио је јонизацију протеинских молекула без фрагментације. Најчешће две методе меке јонизације су: електроспреј (electrospray ionization, ЕСИ) и МАЛДИ (matrix-assisted laser desorption/ionization). ЕСИ јонизацијом одређеног молекула протеина не настаје само један молекулски јон, већ читав спектар јона, а сваки јон има једно наелектрисање више од претходног јона у спектру [4]. МАЛДИ јонизација се изводи тако што се протеин меша са погодним матриксом, који је у великом вишку, растворен у органском растварачу. Смеша се наноси на плочицу и излаже се вакууму, при чему растварач испарава, остављајући кристале протеина правилно распоређене између кристала матрикса. Када се на плочицу упери ласер, његова енергија се преноси на молекуле матрикса, који делимично испаравају, предајући енергију оближњим молекулима протеина, који прелазе у гасно стање и при томе се и јонизују. Као матрикс најчешће се користи 2,5-дихидрокси бензојева киселина (2,5-ДХБ). Неутрални Н-гликани се тешко јонизују те молекулски јон $[M+H]^+$ није довољно заступљен да би се поуздано детектовао. Ово се превазилази додатком NaCl у матрикс за кристализацију, те гликани претежно јонизују у виду $[M+Na]^+$ јона. Још један проблем МАЛДИ јонизације су кисели гликани који садрже Sia. Даље, у комбинацији са 2,5-ДХБ долази до фрагментације гликана и губитка COOH група. Овај проблем се често решава дериватизацијом гликана пре анализе.

Постоји много типова анализатора у МС, а они користе магнетно или електрично поља. Масени спектрометри велике моћи раздвајања имају више од једног анализатора, нпр. тандем МС (МС/МС). Моћ раздвајања у МС представља способност инструмента да раздвоји два пика са незнатном разликом у вредности m/z . Јединица мере је обично ppm (parts per milion). Линеарни динамички опсег m/z је опсег у коме је интензитет јонског сигнала линеарно пропорционалан концентрацији анализата. Анализатори на бази времена лета

(time of flight, ТОФ) користе електрично поље да убрзају јоне и онда мере време потребно једном јону да доспе до детектора. Честице истог наелектрисања имаће исту кинетичку енергију, те ће време лета до детектора зависити само од њихове масе. Јони мање масе ће први бити детектовани. Анализатори на бази квадрипола (quadrupole) користе осцилаторно електрично поље да селективно стабилизују или дестабилизују путање јона који пролазе кроз радиофреквентно поље квадрипола (поље које се ствара између 4 паралелне електроде). Овакво поље пропушта само јоне чије m/z вредности у одређеном тренутку упадају у дефинисани опсег. Затим се, променом потенцијала на електродама, пропуштају они јони чије m/z вредности упадају у наредни опсег итд. Овакав анализатор ради као филтер који пропушта само одређене опсеге молекулских маса. МС инструмент велике моћи раздвајања може да садржи и три анализатора на бази квадрипола - тзв. triple quad. Први квадрипол служи као масени филтер за молекулске јоне тако да се одређени јон пропушта до другог квадрипола, који представља простор за сударе. Ту се јон разбија у мање фрагменте, који иду до трећег квадрипола који делује опет као филтер маса који пропушта само одређени јон до детектора. Квадрипол се подеси тако да се помера од мањих ка већим масама те се добија потпуни масени спектар. Од других типова анализатора користи се још и неколико верзија јонских замки (ion trap), као што је Orbitrap.

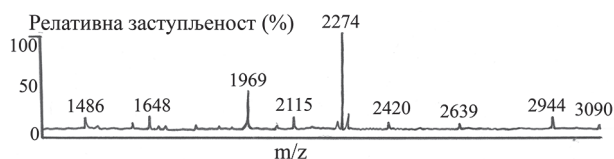
Трећа важна компонента МС инструмента је детектор. Детектори бележе или наелектрисање које настаје или струју коју производи молекулски јон који пролази кроз детектор или удара у површину детектора. Сигнал настао у детектору се преводи у масени спектар.

Тандем МС инструмент може да обави два или више циклуса масене спектрометрије, између којих се обично одради нека врста фрагментације молекула. На пример, у једном тренутку, један анализатор изолује само један пептид (од многих који уђу у спектрометар), потом се у другом анализатору пептидни јони сударају са молекулима гаса, што узрокује фрагментацију пептида; трећи анализатор сортира фрагменте настале из пептида.

Кад се специфична комбинација извора јонизације, типа анализатора и типа детектора уобичаји у пракси, обично настане и посебна скраћеница за ту МС анализу. Најбољи пример је МАЛДИ-ТОФ, који комбинује МАЛДИ методу јонизације са ТОФ анализатором.

У тексту који следи биће описан један од начина за примену МС у анализи гликана - профилисање Н-гликана гликопротеина из хуманог серума употребом МАЛДИ-ТОФ МС анализе [5]. Након дигестије серумских протеина ПНГ-азом Ф, Н-гликани се екстрахују и подвргавају перметиловању, мада се овом техником могу анализирати и недериватизовани гликани. Висина сваког пика (јачина сигнала) на масеном спектру

одражава релативни садржај тог гликана у узорку (Слика 4).



Слика 4. МАЛДИ-ТОФ МС анализа укупног серумског Н-гликома здраве особе (гликани су метиловани, Me). Главни пик на m/z 2274 одговара гликану састава $\text{SiaMe}_2\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4$, док веома сличан гликан, само са једним остатком Sia даје пик на m/z 1969 ($\text{SiaMeHex}_5\text{HexNAc}_4$). Одговарајући гликани са остатком L-Fuc у језгру гликана примећени су на m/z 2420 ($\text{SiaMe}_2\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{DeoxyHex}$) и 2115 ($\text{SiaMeHex}_5\text{HexNAc}_4\text{DeoxyHex}$). Преузето из [5].

Као што се види из примера, МАЛДИ-ТОФ МС само делимично одражава комплексност серумског Н-гликома, јер се не виде ни број ни положај антена, ни уметнути остатак GlcNAc , нити терминални остаци α -1,3 Fuc, α -1,6 Fuc, α -2,3 Sia или α -2,6 Sia. Кад би се ове ставке узеле у обзир и помножиле бројем пикова уочљивим на спектру, настао би велики број различитих могућих структура Н-гликана у серуму. МАЛДИ-ТОФ МС урађен на овај начин открива само главне групе гликана, а свака група представља смешу изомерних структура. На срећу истраживача, у већини случајева у којима долази до измењеног гликозовања серумских протеина (нпр. канцер и цирроза јетре), оваква анализа је довољно добра да открије квантитативне и квалитативне разлике у структури гликана између здраве популације и оболелих особа [5].

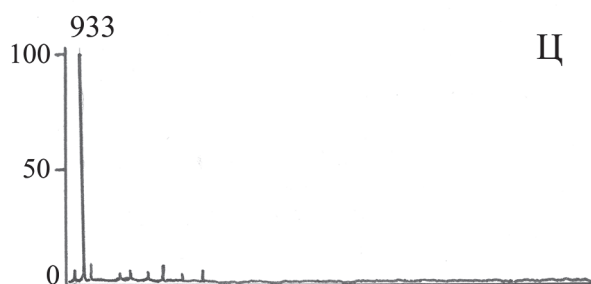
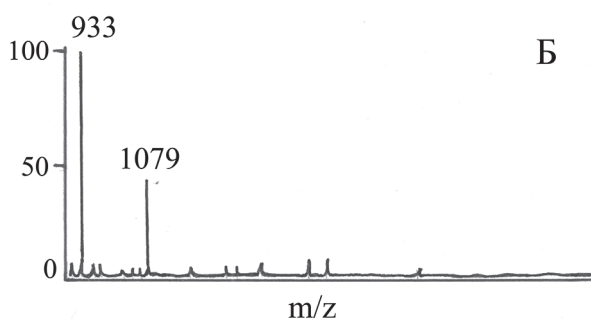
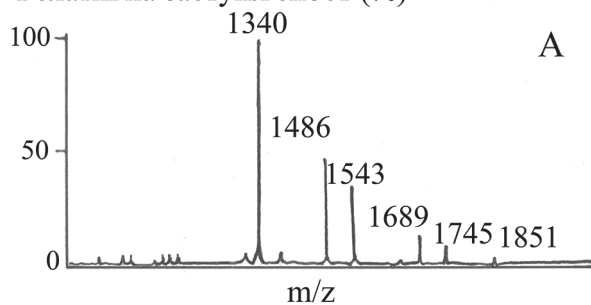
Понекада је потребно испитати који типови гликозидних веза повезују моносахаридне остатке унутар гликана. Тада се ради анализа везе (linkage analysis), за коју су потребне егзогликозидазе. Егзогликозидазе се у МС користе као помоћ у расветљавању структуре гликана на начин који је веома сличан ономе примењеном при ХПЛЦ анализи. Наиме, један исти узорак се подвргава МС анализи пре и после третмана егзогликозидазама (Слика 5). Добијени масени спектри се упоређују и закључује се који је сахарид био на крају ланца.

На слици 5 су приказани МАЛДИ-ТОФ МС спектри узорака добијених из серумских гликана (са којих је прво скинута терминална Sia) након дигестије егзогликозидазама. Након дигестије β -галактозидазом (Слика 5А), на профилу Н-гликана уочава се седам молекулских јона: m/z 1340 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$), 1486 ($\text{Fuc}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$), 1543 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_5$), 1689 ($\text{Fuc}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_5$), 1745 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_6$), 1851 ($\text{Fuc}_1\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5$) и 1892 ($\text{Fuc}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_6$). Ове структуре се проналазе уношењем вредности маса добијених МАЛДИ ТОФ анализом у одговарајући програм, на пример у GlycoMod Tool^{а)} Швајцарског института за биоинформатику. Овај програм предвиђа

^{а)} <http://web.expasy.org/glycomod>

^{б)} <http://glycosuitedb.expasy.org/glycosuite/glycodb>

Релативна заступљеност (%)



Слика 5. МАЛДИ-ТОФ МС анализа укупног серумског Н-гликома (десијалинизованог) здраве особе након дигестије егзогликозидазама (преузето из [5]). А) серум третиран β -галактозидазом, Б) серум третиран комбинацијом β -галактозидазе и β -Н-ацетилхексозаминидазе и Ц) серум третиран комбинацијом β -галактозидазе, β -Н-ацетилхексозаминидазе и α -фукозидазе.

структуре гликана на основу експериментално одређених молекулских маса. Такође се може користити база података GlycoSuite, Proteome Systems^{б)}, која садржи 9436 структура гликана унетих из 864 референце. Појава ових пикова, којих није било на спектру Н-гликана пре дигестије β -галактозидазом, значи да су гликани били ефикасно дегалактозиловани и да је Gal била везана β -гликозидном везом на крају ланца гликана. Након дигестије истог узорка комбинацијом β -галактозидазе и β -Н-ацетилхексозаминидазе (Слика 5Б), на спектру Н-гликана се уочавају само два молекулска јона: m/z 933 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$) и 1079 ($\text{Fuc}_1\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$). Из овога се види да су остаци GlcNAc претходили остацима Gal за које су били везани уобичајеним β -гли-

козидним везама. И коначно, након дигестије истог узорка комбинацијом β -галактозидазе, β -Н-ацетилхексозаминидазе и α -фукозидазе (Слика 5Ц), молекулски јон на m/z 1079 је нестао и остао је само пик на m/z 933 ($\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$), јер је L-Фус скинута са Н-гликана.

Квантификација гликана се често изводи комбиновањем ХПЛЦ анализе и МС. Згодно је уочити најинтензивнији пик на масеном спектру, те на основу m/z и ослањајући се на базе података пронаћи који је то гликан. Тај се гликан може купити у чистом облику (стандард), накачити му флуоресцентну пробу и тачно одмерену количину убризгати у ХПЛЦ колону. Поређењем интензитета сигнала који даје стандард и сигнала који даје исти тај гликан у узорку израчунава се апсолутна концентрација гликана у узорку. Из односа висина пикова овог гликана и осталих гликана у масеном спектру израчунавају се концентрације свих гликана у узорку.

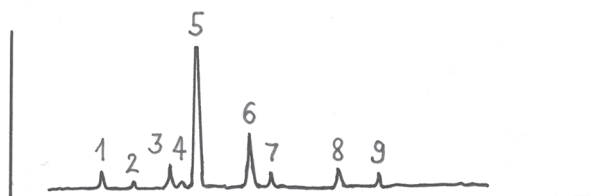
Последњих година постала је јако популарна ХПЛЦ апаратура повезана са масеним спектрометром. Као стационарна фаза течне хроматографије користи се порозни графит (porous graphite carbon, ПГЦ), а гликани се анализирају у нативном облику. Детекција се врши помоћу масеног спектрометра са платформом за ЕСИ јонизацију. Ова метода се у литератури означава са ПГЦ-ЛЦ-ЕСИ-МС.

ПОСТОЈИ ЛИ И НЕШТО ТРЕЋЕ?

Наравно да постоји. Једноставна је за извођење и назива се ДСА-ФАЦЕ (DNA sequencer adapted-fluorophore assisted carbohydrate electrophoresis). Ова метода је нарочито развијена за анализу Н-гликана из протеина серума (плазме), мада се може употребити и за анализу других телесних течности [6]. Метода је осетљива, поуздана и може раздвојити стереоизомере гликана. Узорци се припремају једноставно, на плочама са 96 бунарчића. Потребно је још имати и ДНК секвенатор који ради на принципу капиларне електрофорезе, чија је основна намена секвенцирање ДНК.

Метода се састоји од неколико корака: издвајање гликана из гликопротеина, дериватизација добијених гликана, скидање Sia са гликана, раздвајање смеше гликана капиларном електрофорезом и анализа добијених резултата. Узорак гликопротеина се најпре третира ПНГ-азом Ф, настали Н-гликани се потом обележавају флуоресцентном пробом те се излажу дејству ензима α -сијалидазе. Као флуорофора се користи 8-аминопирен-1,3,6-трисулфонат (АПТС) из два разлога: 1) ДНК секвенатор је опремљен аргонским ласером који емитује светлост таласне дужине 488 nm; АПТС-дериватизовани гликани прилично апсорбују у овој области, за разлику од самог АПТС који слабо апсорбује ову светлост; након апсорпције следи флуоресцентна емисија обележених гликана на 512 nm, док АПТС опет слабо емитује у овој области; тако је могућа детекција АПТС-обележених гликана без одвајања вишка реагенса. 2) Обзиром да гликани углавном немају никакво наелектрисање, нужно је накачити им неки молекул који је довољно наелектрисан да би се могли кретати у елек-

тричном пољу, што је предуслов за електрофоретско раздвајање. АПТС има троструко негативно наелектрисање. Обзиром да сваки гликан везује само један молекул АПТС на свом редукујућем крају, сви гликани имају исто наелектрисање те се електрофоретско раздвајање заснива на разликама у њиховој молекулској маси (и облику). Остаци Sia се уклањају пре електрофорезе АПТС-гликана, јер имају сопствено негативно наелектрисање (а нема их на свим гликанима), што би онемогућило тумачење резултата. Узорци се раздвајају у секвенатору, електрофорезом на капиларним матрицама напуњеним линеарним полимером полиакриламида. Као унутрашњи стандарди могу се користити комерцијално доступни стандарди Н-гликана, такође обележени АПТС-ом. Резултати се анализирају применом одговарајућег софтвера или ручно. На слици 6 је приказан типичан изглед профила Н-гликана из серума здравих особа.



Слика 6. Типичан профил раздвајања десиијалинованих Н-гликана из укупних протеина хуманог серума техником ДСА-ФАЦЕ. Пик 1 је NGA_2F , пик 3 и 4 су $\text{NG}_1\text{A}_2\text{F}$, пик 5 је NA_2 , пик 6 је NA_2F , пик 7 је NA_2FB , пик 8 је NA_3 , пик 9 је NA_3Fb [7].

На слици 13 се уочава девет пикова, који потичу од Н-гликана који су били ковалентно везани за најзаступљеније гликопротеине серума, а то су: имуноглобулин Г (8-16 g/L), трансферин, α -2-макроглобулин, имуноглобулин А, α -1-антитрипсин, комплемент С3, имуноглобулин М и хаптоглобин. ДЦА-ФАЦЕ има један недостатак, а тај је да се не може добити информација о Sia у гликанима који се испитују, те се она мора посебно одређивати. ДСА-ФАЦЕ је метода за профилсање гликана, а не метода за испитивање структуре гликана, осим уколико се не искомбинује са дигестијом гликана различитим егзогликозидазама.

Примена нуклеарне магнетне резонанце (НМР) у анализи гликана се заснива на мерењу ефекта степена дисторзије магнетног поља у присуству гликана. Метода није деструктивна и пружа пуну информацију о структури гликана. Зашто се онда ретко користи? Прво, потребна је релативно велика количина пречишћеног гликана за НМР анализу. Друго, опрема је јако скупа и потребно је обучено особље.

Секвенцирање гликана је моћна техника одређивања секвенце моносахарида у гликану. Прво је потребно раздвојити смеше гликана на појединачне гликане. Сваки од ових гликана се независно излаже дејству гликозидаза, специфичних за поједине гликозидне везе. Продукти ензимске дигестије се морају испитивати НП-ХПЛЦ или МАЛДИ-ТОФ МС, о чему је већ било речи.

Гликомика је једна од научних дисциплина биохемије која се, упркос својој комплексности, брзо развија, можда баш зато што користи најмодерније инструменталне методе.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Gates, E. Rathbone, L. Masterson, I. Wright, A. Electricwala. In: Glycoprotein analysis manual, 1st edition, Sigma-Aldrich (2004).
2. O. Gornik, J. Wagner, M. Pučić, A. Knežević, I. Redžić, G. Lauc. Glycobiology, **19** (2009) 1547.
3. L. Royle, C.M. Radcliffe, R.A. Dwek, P.M. Rudd. Methods Mol. Biol., **347** (2006) 125.
4. J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse. Science, **246** (1989) 64.
5. W. Morelle, C. Flahaut, J.-C. Michalski, A. Louvet, P. Mathurin, A. Klein. Glycobiology, **16** (2006) 281.
6. V. Vanhooren, W. Laroy, C. Libert, C. Chen. Biogerontology, **9** (2008) 351.
7. C. Chen, H. Schmilovitz-Weiss, X. Liu, O. Pappo, M. Halpern, J. Sulkes, M. Braun, M. Cohen, N. Barak, R. Tur-Kaspa, V. Vanhooren, H. Van Vlierberghe, C. Libert, R. Contreras, Z. Ben-Ari, J. Proteome Res., **8** (2009) 463.

Abstract

TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF GLYCAN STRUCTURE

Romana MASNIKOSA, Institute for the Application of Nuclear Energy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia (romana@inep.co.rs)

This paper describes various approaches for determining the structures of N-glycans attached to proteins. Specific chemical, enzymatic and other analytical strategies as well as mass spectrometric methods that lead to complete glycan sequence determination are described. For a typical mammalian glycoprotein, the aim is often to identify the correct structure from a range of known or predictable candidate structures. For glycans from bacteria or less well-characterized organisms, it is hard to make predictions, and structural determinations are performed without any assumptions. Choice of methodology is often dictated by the amount and purity of material available and its source (e.g., from tissue samples or cultured cell lines). If quantities are not limiting, the complete primary structure may be determined. In most situations where purity and/or amounts are not optimal, partial characterization will usually be possible. The sensitivity of methods for glycan structural analysis continues to increase with technological advances.



Наташа ПЕЈИЋ, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, Катедра за физичку хемију и инструменталне методе, Е-пошта: nata@pharmacy.bg.ac.rs

ЗЕЛЕНА ПРИЧА О АЛКИЛ ПОЛИГЛИКОЗИДИМА

Сурфактантни су сујстианце специфичне хемијске структуре које смањују површински напон течности у којој су растворени или дисперговани; они су основни састојци широко коришћених производа као што су детерџенти, козметички препарати, доје и есенцијали, а многи су нафтени деривати. Зелени сурфактантни су површински активне материје које се добијају из биљних уља (нпр. из њалминој или кокосовој уља) и биљних уљених хидрата (нпр. шећерне турске или жиљарица) и представљају основне састојке различитих биоразградивих и диокомпабилних производа. Њихово коришћење је одговор на све већу потражњу произвођача за производима који су "зеленији", блажи и ефикаснији, због чега је добијање зелених сурфактаната из природно обновљивих извора концепт који се све више користи у индустрији детерџената и козметики. У овом контексту, алкил полигликозиди (АПГ) су кључни зелени сурфактантни чија улога представља одлично решење за произвођаче чији је циљ комбиновање ефикасности и безбедности у финалном производу. Ово је прича о њима.

УВОД

Алкил глукозиди (АГ) или алкил полигликозиди (АПГ) су нова генерација врло ефикасних, нејонских

сурфактаната који се индустријски синтетишу из масних алкохола и шећера добијених из јефтених, природно обновљивих извора. Индустријски процес добијања АПГ заснива се на Фишеровој гликозидацији Д-глукозе са неким масним алкохолом при чему се добија сложена смеша алкил моно-, ди-, три- и олигогликозида. Алкил полигликозиди имају широк спектар примене и користе се у козметичким препаратима, као сурфактанти у детерџентима и индустријским средствима за чишћење, у пољопривреди, итд. Како је коришћење ових нетоксичних сурфактаната еколошки безбедно, АПГ се називају "зелени" сурфактанти.

Шта квалификује неку хемијску супстанцу да буде "зелена"? Да би она то била, потребно је да испуњава следеће захтеве:

- органски (у њеној производњи се избегава коришћење генетски модификованих састојака и пестицида)
- природни (избегнуто коришћење синтетичких производа)
- еколошки (избегавање производа који нису биоразградиви или су токсични за животну средину).

Тако, за добијање зеленог сертификата за одређени производ, потребно је да се користе сурфактанти са до-

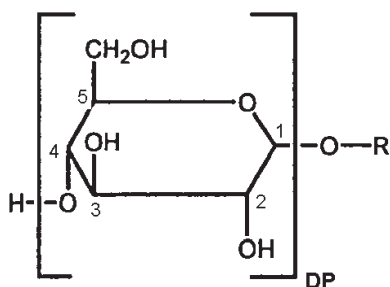
брим еколошким особинама (екосурфактанте), као што су АПГ. За постизање овог циља неопходно је користити обновљиву и јефтину биомасу која је доступна у великој количини и дизајнирати зелене процесе који омогућавају добијање иновативних молекулских структура побољшаних перформанси, повољних еколошких својстава и незнатног утицаја на животну средину.^{a)}

Алкил полигликозиди се данас сматрају најважнијим сурфактантима на бази шећера. Ови сурфактанти су тестирани у многим еколошким испитивањима при чему је нађено да приликом њихове минерализације, тј. разлагања на угљен-диоксид и воду, не долази до формирања по околин у штетних интермедијера, нити непожељних нуспроизвода као што су азот и етилен оксид. Због свега овога АПГ су препознати као идеални зелени сурфактанти, што производе који садрже АПГ чини врло значајним и издваја од других који се конвенционално користе.

Прича о алкил полигликозидима обухвата различите аспекте који се односе на историјат, синтезу, индустријску производњу, еколошко-токсиколошке карактеристике и области примене.

АЛКИЛ ПОЛИГЛИКОЗИДИ: ИСТОРИЈАТ И ДЕФИНИЦИЈА

Алкил глукозиди или алкил полигликозиди (слика 1), припадају групи нејонских сурфактаната на бази шећера. Ова амфифилна једињења се индустријски синтетишу из масних алкохола и угљених хидрата који се добијају из јефтених природно обновљивих извора: масни алкохоли из уља сунцокрета, соје или кокоса, а угљени хидрати из шећерне трске, репе или житарица.



Слика 1. Структурна формула алкил полиглукозида; DP – степен полимеризације; R – C_nH_{2n+1} ($n = 8, 10, 12, 14, 16$ или 18)

АПГ су откривени у 19. веку, међутим дуго времена су имали само академски значај. Немачки хемичар Емил Фишер^{b)} (*Emil Fischer*) је 1893. године синтетисао и идентификовао алкил полиглукозиде комбинујући масне алкоhole и глукозу добијене из кокосовог уља и кукуруза. Прва примена АГ у детергентима почела је четрдесетак година касније у Немачкој. Међутим, прошло је много година док није започета индустриј-

ска производња АПГ, вероватно због постојећих тешкоћа у производном процесу. Ипак, средином 1970. год. компаније *Rohm & Haas* (САД) и *Seppic* (Француска), производе октил/децил ($C_{8/10}$) полигликозиде и уводе их на тржиште под називом TRITON BG 10 i TRITON CG 110. Ипак, ови производи са кратким алкилним ланцем, нису имали задовољавајуће сурфактантске особине тако да је њихова примена била ограничена. На побољшању особина ових сурфактаната, као и производњи нових АПГ радиле су различите компаније, између осталих, *BASF* (Немачка), *Akzo Nobel* (Шведска), *Henkel* (Немачка), *ICI* (Енглеска), *SEPPIC* (Француска) и *Union Carbide* (САД). Од почетка осамдесетих година двадесетог века почиње производња АПГ са дугачким алкил ланцима ($C_{12/14}$ -АПГ), а интересовање за АПГ константно расте, с обзиром на пораст бриге за животну средину, али и због тога што су препознате велике могућности примене АПГ у козметичкој, као и у индустрији детергената. Крајем деведесетих година, с обзиром на број примењених патената, компаније које су предњачиле у производњи АПГ су биле: *Procter & Gamble* (САД), *Henkel, Kao* (Јапан), *Hüls* (Немачка) и *SEPPIC*.

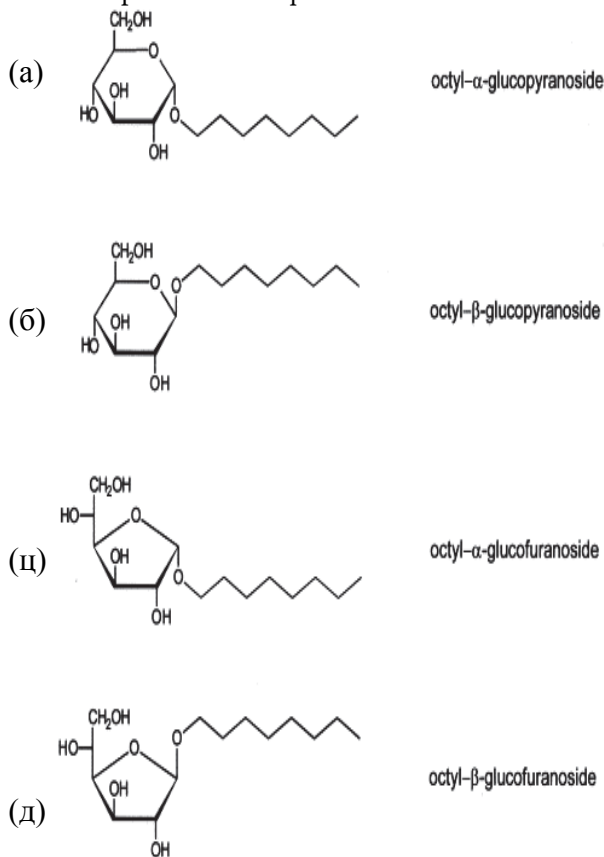
Алкил полиглукозиди су алкил полигликозиди добијени из глукозе. У индустријским процесима синтезе АПГ примењује се принцип Фишерове синтезе: реакцијом између глукозе и хидрофобних алкохола са дужином угљоводоничног ланца од октил (C_8) до октадецил (C_{18}), реакциони производи нису чисти алкил-глукозиди, већ комплексна смеша алкил моно-, ди-, три- и олигогликозида. Због тога се индустријски добијени реакциони производи зову алкил полигликозиди. Њих карактерише одређена дужина алкилног ланца и средњи број јединица глукозе које су везане за алкилни ланац (степен полимеризације, DP). При синтези АПГ, концентрација појединачних олигомера (моно-, ди-, три-, итд. гликозида) у смеси, зависи од односа моларних концентрација глукозе и масног алкохола. Уколико је алкохол у вишку, добијају се производи са мањим DP вредностима. Средњи DP је врло важна физичко-хемијска карактеристика АПГ која одређује поларност и растворљивост датог АПГ, а самим тим и област његове примене.

Хемијски, АПГ су ацетали (слика 1), где R означава алкилни ланац масног алкохола са 8–18 угљеникових атома. Алкил полигликозиди који су важни за различите примене имају DP између 1,1 и 1,8 и у највећем уделу садрже алкил моноглукозид. Међутим, како и алкил моноглукозид постоји у четири различита изомерна облика: алкил- α -D-глукопиранозид, алкил- β -D-глукопиранозид, алкил- α -D-фуранозид и алкил- β -D-фуранозид, (слика 2), као што је поменуто, при синтези АПГ, поред ових настају и други изомери, тако да су

a) У овом контексту, морске алге, као богат извор сложених полисахарида и олигосахарида, могу се користити као полазна сировина за добијање нове генерације зелених сурфактаната и козметичких састојака.

b) За извредни истраживачки рад у вези са реакцијама синтезе пурина и шећера као и њихову примену, *Hermann Emil Fischer* (1852 – 1919) је 1902. год. добио Нобелову награду из области хемије.

АПП комплексне смеше чији се састав не може једноставно и стриктно квантификовати.



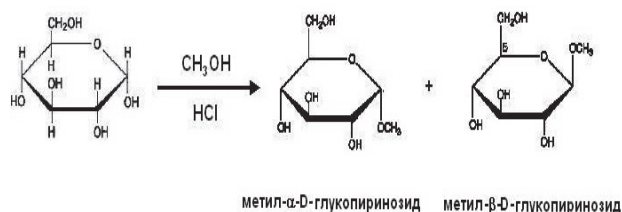
Слика 2. Изомери алкил моноглюкозида: (а) алкил- α -D-глюкопиранозид, (б) алкил- β -D-глюкопиранозид, (ц) алкил- α -D-фуранозид и (д) алкил- β -D-фуранозид

СИНТЕЗА АЛКИЛ ПОЛИГЛЮКОЗИДА

Алкил глюкозиди се синтетишу реакцијама гликозидације које имају врло важну улогу у хемији угљених хидрата. Прве гликозидне синтезе извршили су А. Мајкл (A. Michael) (1879. год.) (синтеза арил-гликозида из гликозил-халогенида) и Е. Фишер (1893) (синтеза алкил гликозида из хемиацетала), а откриће првог, контролисаног поступка гликозидације приписује се В. Коенигу (W. Koening) и Е. Кнору (E. Knorr) (1901. год.) (синтеза гликозида из гликозил-бромидна или гликозил-хлорида у присуству соли сребра). Е. Фишер и Б. Хелферих (B. Helferich) су први синтетисали алкил глюкозид дугог ланца са сурфактантским особинама, 1911. године. Ипак, на почетку 21. века, ефикасна и стереоспецифична синтеза АПП представља велики изазов у органској и биоорганичкој хемији, јер је од првих синтеза глюкозида до данас, показана сва сложеност процеса гликозидације.

Најранији радови Е. Фишера су се односили на синтезу алкил глюкозида базирану на реакцији глюкозе

са хидрофилним алкохолима (метанол, етанол, глицерол, итд.) (слика 3).



Слика 3. Фишера синтеза гликозида

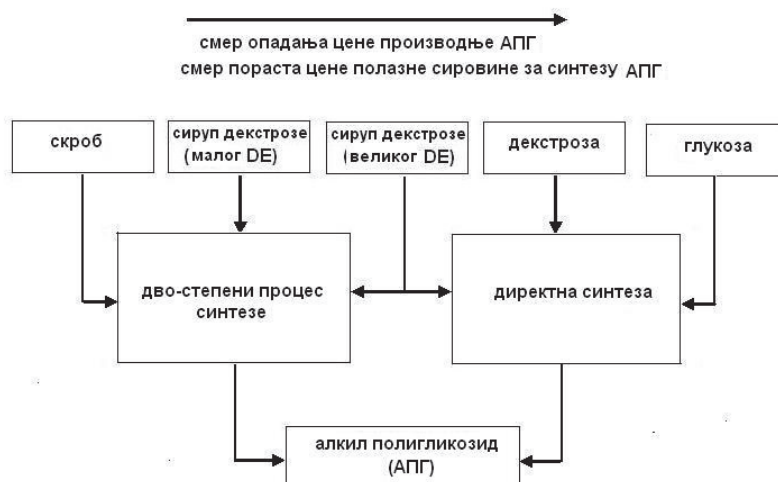
Селективно превођење хемиацеталне групе у ацеталну врши се помоћу алкохола у присуству разблажене хлороводоничне киселине као катализатора, при чему се добија комплексна смеша реакционих продуката (равнотежна смеша α и β глюкопиранозидна, фуранозидни изомери као и глюкозидни олигомери) и вода.

За синтезу АПП, поред фундаменталног приступа, познатог под називом "Фишера гликозидација", постоје и друге методе, од ефикасних и стереоспецифичних процеса који укључују коришћење одређених заштитних група при којима настају специфични производи, до неселективних процеса при којима настају смеше комплексних изомера и олигомера. Реакције синтезе су сложене и одвијају се у више ступњева уз коришћење специјалних реагенаса (блокирајућих група) чија је улога активирање центара аномера и заштита хидроксилене групе. Постоји велики број других метода за синтезу АПП, као што су поменута *Koenig-Knorr-ova* синтеза АПП (транс-гликозидација), *Lewis*-кисели метод, *Schmidt*-ов метод синтезе АПП кисело-базном алкиловањем и ензимски катализована синтеза. Ипак, индустријска производња АПП базира се на Фишеровој синтези и представља пример савременог технолошког процеса (технологија без емисије штетних гасова и опасних материја) при коме се степен полимеризације продуката може контролисати у широком опсегу.

При синтези АПП, за образовање хидрофобног дела молекула, користе се масни алкохоли. Они^{а)} се добијају из обновљивих извора (масти и уља), трансестерификацијом и фракционисањем масти и уља (триглицерида) при чему настају одговарајући метил естри масних киселина који затим подлежу хидрогенацији. У зависности од жељене дужине алкил ланца масног алкохола, као полазни материјали могу се користити кокосово или палмино уље (за алкохоле са угљоводоничним ланцем са 12 и 14 угљеникових атома) или лој, палмино уље или уље из уљане репице (за алкохоле са угљоводоничним ланцем са 16 и 18 угљеникових атома). Хидрофилни део молекула АПП потиче од шећера. Као полазни материјал за синтезу АПП могу се користити полимерни шећери (скроб из кукуруза, пшенице или кромпира, или сируп глюкозе са малом DE^{б)} вредношћу) или мономерни шећери (нпр. анхидрована

а) Масни алкохоли се могу добити и из петрохемијских извора (синтетички масни алкохоли).

б) Дектрозни еквивалент (DE) представља количину редукујућих шећера изражену као D-глюкоза и израчунат као проценат у односу на масу узорка.



Слика 4. Угљени хидрати као полазне сировине за индустријску синтезу алкил полигликозида; DE – дектрозни еквивалент

глюкоза, глюкоза монохидрат (декстроза), или сируп глюкозе са великом DE вредношћу) (слика 4). Избор полазне сировине зависи, како од његове цене, тако и од цене производног процеса. Генерално, цена полазног материјала се повећава у следећем смеру: скроб, сируп глюкозе, декстроза и анхидрована глюкоза, док се цена опреме, тј. производње у истом смеру смањује (слика 4). Због тога треба наћи оптималну комбинацију за појефтинјење производње АПГ. Тако, иако је скроб јефтинији од D-глюкозе, производња АПГ из скроба захтева примену сложеније експерименталне процедуре у односу на експерименталне услове гликозидације D-глюкозе или транс-гликозидације једноставних алкил-глюкозида.

ПРОЦЕДУРЕ ИНДУСТРИЈСКЕ СИНТЕЗЕ АЛКИЛ ПОЛИГЛИКОЗИДА

У зависности од врсте коришћеног полазног материјала, процес конверзије угљених хидрата у АПГ Фишером синтезом може се одвијати преко:

- једноставног процеса (директно), или
- двостепеног процеса (трансацилијација).

Директна синтеза је једноставнија у погледу коришћене експерименталне опреме. АПГ дугог угљоводоничног ланца се добија директном реакцијом масног алкохола и угљеног хидрата који се претходно суши; сушењем, тј. уклањањем кристалне воде из угљеног хидрата (нпр. декстрозе), равнотежа ове реакције помера се на страну настајања продукта и минимизирају се друге, конкурентске реакције. У овом поступку, реакција између глюкоза и алкохола који је у вишку, одвија се на температури од 100–120 °C у присуству киселог катализатора (најчешће сулфонска киселина). Након уклањања воде (у условима вакуума), реакциони производ је смеша алкил моно-, олиго- и полигликозида. Средњи степен полимеризације добијених АПГ зависи од односа глюкозе и алкохола у реакционој смеси, а за идентификацију и карактеризацију појединачних јединица могу се користити различите инструменталне методе као што су течна хроматографија под високим

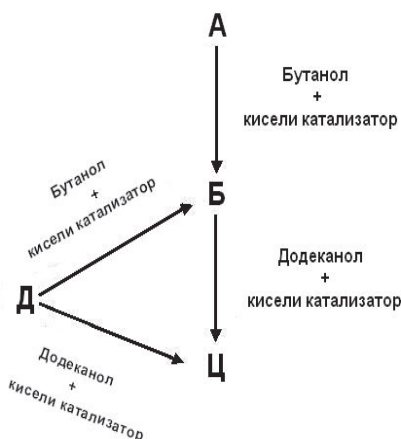
притиском, танкослојна хроматографија, гасна хроматографија, нуклеарна магнетна резонанција, итд.

Двостепени процес (транс-ацетијација) је сложенији од претходног и примењује се када се као полазни материјал користе олиго- и полигликозе (нпр. скроб или сирупи са малим DE вредностима). У првом кораку овог процеса угљени хидрат реагује са алкохолом који има кратак ланац (нпр. n-бутанол или пропиленгликол) и по потреби деполимеризује. У следећем кораку, алкил гликозид кратког ланца се трансацилизује помоћу алкохола са дугим ланцем (нпр. C_{12/14}) дајући финални АПГ. Ако су моларне концентрације шећера и алкохола једнаке, расподела олигомера добијених трансацилијационим процесом је суштински једнака као код директне синтезе. У овом поступку, потребна деполимеризација полазног материјала захтева високе температуре (веће од 140 °C). Такође, у зависности од коришћеног алкохола за синтезу, у систему се може креирати високи притисак; ово намеће коришћење посебне опреме, као и строжије захтеве за контролу процеса што може повећати цену производње. Поједностављени схематски приказ синтезе алкил полигликозида приказан је на слици 5.

ЕКОЛОШКО-ТОКСИКОЛОШКЕ И ДЕРМАТОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ АПГ

Алкил полигликозида се углавном користе у производима за прање посуђа и веша, козметичким препаратима и различитим производима за чишћење, који се након употребе инкорпорирају у водену средину. Генерално, утицај сурфактаната на животну средину је нераскидиво повезан са њиховом биолошком разградљивошћу, а брза и комплетна биоразградивост јесте најважнији услов који треба да испуњава еколошки компатибилан сурфактант. Утицај на животну средину различитих хемикалија првенствено се огледа у њиховој екотоксичности, која је релативно велика у случају сурфактаната због њихове површинске активности и утицаја на биолошке мембране.

Рутински аналитички поступак за одређивање биоразградивости неког сурфактанта, односно мерење уклањања бизмут-активне супстанције (BiAS)^{a)} не може се применити у случају АПГ, јер они не реагују као BiAS. Међутим, Организација за економску сарадњу (OECD) је дефинисала тестове биоразградивости (OECD серија 301), који омогућавају реалну процену биоразградљивости већине хемикалија. Помоћу њих се утврђује коначна биоразградивост испитиваних једињења, тј. њихова микробиолошка трансформација у финалне производе (угљен-диоксид, воду и бактеријску биомасу). У складу са OECD, АПГ са 12 и 14 угљеникових атома анализирају се на три начина: тестом затворене боце (OECD 301 D), модификованим OECD скрининг тестом (OECD 301 E) и DOC тестом нестајања (OECD 301 A).



Слика 5. Процедуре синтезе алкил полигликозида, А – скроб; Б – бутил олигогликозид; Ц – додецил полигликозида; Д – глукоза

Добијени резултати показују врло велики степен крајње биоразградивости АПГ. Најтачнији метод, OECD 301 D, показује да постигнути ниво минерализације АПГ износи 88%, односно 72% при концентрацијама 2 mg mL^{-1} , односно 5 mg mL^{-1} , што је више од минимума прописаног од стране OECD. На крају, резултати различитих OECD тестова биоразградивости недвосмислено показују да АПГ у животној средини подлежу брзој и комплетној биоразградивости.

Стратегија утврђивања токсиколошке безбедности^{b)} у коришћењу неког хемијског производа требало би да буде заснована на следећим циљевима:

- правилно руковање које треба да искључи појаву нежељених споредних ефеката и
- процена ризика код неправилне употребе, као и друготрајне изложености (због споре биоразградивости) која не би требало да изазове озбиљније здравствене проблеме.

a) Према европским прописима, прихваћени степен биоразградивости анјонских сурфактанта јесте уклањање $\text{BiAS} \geq 80\%$.

b) Предмет токсиколошких испитивања јесте процена ризика при коришћењу одређених хемијских производа, са циљем утврђивања њиховог штетног утицаја на здравље корисника и евентуалних негативних ефеката након неправилне употребе. Процена стварних ризика је могућа ако се хемикалије тестирају при одговарајућим условима изложености који подразумевају начин примене, трајање и учесталост изложености. У супротном, могу се извући погрешни закључци.

c) Процењена токсичност након поновљених оралних апликација износи 1000 mg по килограму телесне тежине.

d) LD_{50} је скраћеница за леталну дозу, тј. количину производа који изазива смрт половине групе тестираних животиња код дерматолошког или оралног апликовања производа.

Након утврђивања токсиколошке безбедности, за карактеризацију биолошких особина неког производа, данас су дефинисане стратегије тестирања, које се базирају на директном испитивању ефеката на кожи волонтера у случају коришћења АПГ.

Дерматолошки, АПГ представља нову класу веома благих сурфактанта, који су, у зависности од врсте производа, изузетно погодни за употребу као појединачни сурфактанти или косурфактанти у формулацијама производа са изузетно благим својствима. Оптимална дерматолошка компатибилност за различите производе за чишћење, може се постићи пажљивим избором дужине ланца и степена полимеризације сурфактанта, носача или растварача, и нарочито формулације препарата. На основу релевантних токсиколошких тестова, утврђено је да АПГ различитих дужина ланца и различите чистоће нису токсични или штетни, али у већим концентрацијама делују иритирајуће на кожу и очи, а могу деловати и сензибилизирајуће на кожу.^{c)} Са друге стране, *in vitro* тестови показују да употреба АПГ не доводи до генетских или хромозомских мутација.

Испитивање безбедности употребе производа на бази АПГ, односи се и на процену ризика при њиховом неодговарајућем коришћењу, као што је случајно гутање одређеног козметичког производа. Вредности акутне оралне токсичности (LD_{50} вредности)^{d)} су реда величине неколико грама по килограму телесне тежине, тако да АПГ не доприносе токсичности козметичких и других производа који се користе у домаћинству.

УПОТРЕБА АЛКИЛ ПОЛИГЛИКОЗИДА И ПЕРСПЕКТИВЕ

Од поменутих првих синтеза АПГ (1893. год.), било је потребно скоро 100 година да се од једноставних лабораторијских експеримената освоји индустријска производња овог зеленог сурфактанта и да се он употреби у различитим производима. Хемијска компанија Когнис (*Cognis*), је 1989. год. успешно дизајнирала индустријски производни процес АПГ који су у почетку коришћени у производима кућне хемије, као и у производима за негу тела. Данас је употреба АПГ врло велика, од пена за купање бебе, детергената и разних производа за прање и чишћење, до лосиона за чишћење лица, шампона, и производа за оралну хигијену, првенствено због њихове компатибилности и синергијског ефекта када се користе у комбинацији са другим сурфактантима.

Присуство АПГ у различитим производима утиче на њихове карактеристике, односно доводи до интересантних појава које су у вези са физичко-хемијским особинама коришћених АПГ.

У одређеном систему који садржи воду, уље и АПГ, додаток косурфактанта^{a)} доводи до драстичног смањења међуповршинског напона^{b)} и до формирања микроемулзије.^{c)} За разлику од микроемулзија на бази етоксиланих нејонских сурфактаната, микроемулзије на бази АПГ су температурски стабилне. За практичну примену, најзначајније су монофазне микроемулзије, а да ли ће доћи до њиховог формирања, или не, зависи од састава система, односно, односа садржаја АПГ и косурфактанта. Тако, микроемулзије се могу формирати комбинавањем хидрофилног емулгатора (АПГ) и хидрофобног коемулгатора (нпр. сорбитан монолаурата (СМЛ)). На пример, у систему додекан, вода, АПГ (C_{12/14}) и СМЛ, тип формиране емулзије зависи од односа концентрација АПГ и СМЛ; када је АПГ у вишку, формира се емулзија типа уље/вода, док се у случају СМЛ у вишку, формира емулзија типа вода/уље. Када је однос АПГ и СМЛ 4:6, хидрофилно/хидрофобне особине смеше емулгатора су избалансиране, и међуповршински напон има минималну вредност (око 10⁻³ mN m⁻¹) који је за један ред величине мањи него у систему који садржи етоксилани масни алкохол. Такође, да би се микроемулзије на бази АПГ могле користити у индустријске и козметичке сврхе, неопходан је одређени састав, односно садржај полазних сировина за добијање производа жељених карактеристика. Тако, основа за већину производа који се користе за негу тела јесте смеша воде (60%), диоктил циклохексана (уљана компонента), смеша АПГ и етар сулфата масног алкохола у односу 5:3 и СМЛ.

Алкил полигликозиди који се користе у детергентима за прање посуђа, као и детергентима за ручно и машинско прање рубља^{d)} имају 12 или 14 угљеникових атома у ланцу и степен полимеризације око 1,4. Ови сурфактанти имају одличне перформансе чишћења^{e)} које готово да не зависе од рН средине. АПГ синергијски интерагују са различитим примарним сурфактантским системима, што омогућава формулисање ефикаснијих детергената са истим, или мањим садржајем активне супстанце. У савременим формулацијама детергената, АПГ осим што квантитативно побољшавају перформансе прања^{f)} преобладају сурфактаната, они и повећавају стабилност производа приликом складиштења.

У последњих десетак година, напредак у коришћењу природних сировина у производима за личну хигијену, огледа се у производњи благих, еколошки компатибилних препарата који штите кожу, а која је у складу

са постављеним стандардима за квалитет. У козметици, АПГ показују интересантне особине. Нпр. додавање АПГ модификује реолошке карактеристике концентрованих смеша сурфактаната које се могу, генерално, користити као козметичке сировине, или као концентрована база у производњи различитих козметичких производа (шампона, пена за купање и туширање, итд.). Формирање пене је суштинска карактеристика козметичких производа за негу и чишћење коже. Алкил полигликозиди имају бољу способност пењења од етоксилата масних алкохола, при чему се обим пене повећава са порастом удела кратких угљоводоничних ланаца у АПГ. Са друге стране, АПГ стабилизује формирану пену нејонског сурфактанта у тврдој води и у присуству себума, тако да се количина коришћеног сурфактанта у одређеном производу може смањити за 20% без промене способности за пењење.

Како су препарати на бази АПГ изузетно благи, њихово коришћење је нарочито погодно код третмана оштећене косе. Након поновљеног третирања косе овим сурфактантом и стандардно коришћеним алкил сулфатом, утврђено^{g)} је да се АПГ адсорбује на власи косе, као и да постоји благи пораст садржаја кисеоника, што указује на то да је АПГ, у поређењу са стандардно коришћеним сурфактантом, делотворнији.

Поред наведених области примене, емулзије и микроемулзије на бази АПГ могу се користити у сапуни-ма, синтетичким детергентима и пастама за зубе. Алкил полигликозиди са 12 и 14 угљеникових атома појачавају дејство неких антибиотика (нпр. хлорохексидина), тако да се у присуству АПГ, са мањом количином овог антибактеријског агенса може постићи иста бактерицидна активност.

Компаније за производњу козметичких препарата, као што је Ив Роше (*Yves Rocher*), почеле су да користе АПГ као благе, "зелене" и биоразградиве сурфактанте од 1990. год. И друге компаније, као нпр. Ековер (*Ecover*) које производе детергенте и еколошке производе за чишћење, потврђују да је коришћење АПГ у поређењу са другим сурфактантима потпуно у складу са концептом одрживости компаније, укључујући и врло важне особине ових сурфактаната као што су потпуна обновљивост, ниска токсичност и потпуна биоразградивост без појаве стабилних метаболита. Тако, у оквиру међународних прописа у вези са еколошким производима, АПГ испуњавају све услове за добијање зеленог сертификата (етикете) као што је Зелени печат (*Green Seal*)^{h)}, ЕУ Еко-цвет (*EU Eco-Flower*), итд.

a) Косурфактанти (најчешће алкохоли са 5–8 угљеникових атома у ланцу) су једињења која у меши са примарним сурфактантом доводе до изразитог повећања агрегације примарног сурфактанта, иако сами немају способност стварања агрегата молекула.

b) Међуповршински напон је напон који се јавља на додиру две течне фазе које се не мешају, или се делимично мешају.

c) Емулзија је хетероген систем једне течности која је диспергована у другој течности (са којом се не меша) у облику капљица (флокула). Посебан тип емулзија су микроемулзије које садрже капљице димензија од 10 nm до 100 nm.

d) АПГ су први пут употребљени у течним детергентима за прање веша, 1989. године.

e) Ове перформансе се могу одредити у складу са нпр. IPP (*Industrieverband Putz und Pflegemittel* – Немачко удружење произвођача средстава за чишћење) стандардом за квалитет.

f) Употреба АПГ као сурфактаната омогућава ефикасније уклањање масних и уљаних флека насталих од маслиновог уља, себума, кармина, крема за лице, итд., чак и на ниским температурама.

g) Техником X-рау фотоелектричне спектроскопије, утврђено је да се оба сурфактанта адсорбују на коси, али након поновљених третмана, у случају алкил сулфата, нема промене у сигналу за нетретирану и третирану косу. У случају АПГ, постоји разлика у сигналу.

Поред њихове компатибилности са животном средином, АПГ нису токсични или штетни по људско здравље; у поређењу са другим сурфактантима изазивају незнатну иритацију коже. Због тога их треба користити у производима за личну негу и кућну хемију, с обзиром на то да ови производи неизбежно долазе у контакт са кожом. Компаративна испитивања различитих сурфактаната који се могу наћи на тржишту, показују да АПГ поседују супериорну нежност у односу на друге сурфактанте и потврђују знак једнакости између "зеленијег" и блажег. Истраживања су такође показала да АПГ имају и високу ефикасност чишћења. Тако, АПГ појединачно, или у комбинацији са другим сурфактантима, производе пену са добрим балансом између обима пене и стабилности у свим производима. Додатна предност коришћења АПГ јесте одсуство етоксилата или сулфата у њиховом саставу као и њихова стабилност у широком опсегу рН, тако да се могу користити како у изразито киселим, тако и у алкалним срединама, без анаеробне деградације која се јавља код других сурфактаната на бази сулфоната.

У оквиру зеленог покрета, потрошачи ће наставити да фаворизују производе са природним и еколошки прихватљивим састојцима. Као последица тога, потражња за изворима зелених сурфактаната ће наставити да расте. Произвођачи који следе зелени покрет препознају бенефите коришћења АПГ и јасно истичу оно што разликује њихове производе од других.

ЛИТЕРАТУРА

1. S. Blagojević, N. Potkonjak, D. Sužnjević, B. Simonović, *Hemijski pregled*, 51 (2010) 39–46.
2. I. Lazarević, *Hemijski pregled*, 43 (2002) 36–41.
3. K. Hill, W. Von Rybinski, G. Stoll (Eds.), *Alkyl polyglycosides: technology, properties and applications*, WCH, Germany, 1997.

4. Balzar D., Lüders H. (Eds.), *Nonionic surfactants: alkyl polyglycoside*, Surfactant science series, 91, New York, Marcel Dekker, 2000.
5. T. Benvegnu, D. Plusquellec, L. Lemiegre, M.N. Belgacem, A. Gandini, *Surfactants from renewable sources: synthesis and applications*, In: *Monomers, polymers and composites from renewable resources*, Elsevier Limited, Amsterdam, 2008.
6. A. Willing, H. Messinger, W. Aulmann, *Ecology and toxicology of alkyl polyglycoside*, In: *Handbook of detergents*, U. Zoller (Ed.), Marcel Dekker, New York, 2004.
7. W. Von Rybinski, K. Hill, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1328–1345.
8. K. Hill, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1255–1264.
9. Balzer D., *Tenside Surf. Det.* 28 (1991) 419–427.

Abstract

GREEN STORY ABOUT ALCYL POLYGLYCOSIDES

N. PEJIĆ, *University of Belgrade, Faculty of Pharmacy, Department for physical chemistry and instrumental methods, e-mail: nata@pharmacy.bg.ac.rs*

Surfactants are substances of specific chemical structure which are capable of reducing the surface tension of liquid they are dispersed; they are basic ingredients of the widely used products such as detergents, cosmetics, paints and pesticides and many petroleum products. The green surfactants are surface active agents which are obtained from natural oils (for example palm or coconut oil) as well as plant carbohydrates (for example polysaccharides from marine algae) and they are main ingredients of both biodegradable and biocompatible products. Their use is a response to growing consumer demands for products that are "greener", milder and more efficient, due to which green surfactants derivation from natural renewable resources is the concept that is increasingly used in industry of detergents and cosmetics. In this context, alkyl polyglucosides (APG) are key green surfactants whose use is an excellent solution for manufacturers who aim to combine efficiency and safety in the final product. In this paper, the author gave a short overview of alkyl polyglycosides as well as further perspective in their uses.



Бранко Ј. ДРАКУЛИЋ, Центар за хемију-ИХТМ, Универзитет у Београду

БОЛНО УЧЕЊЕ ХЕМИЈЕ САВРЕМЕНИМ НАСТАВНИМ СРЕДСТВИМА

Овај њекст је посвећен професорима од којих сам у основној и средњој школи учио хемију: Олији Стојановић, Весни Илић, Радомири Бранковић, Драјану Ђурићу. Људима који, у време када сам похађао школу, нису имали на расплојању савремена наставна средства која данас постоје, али су хемију добро знали и знали су

да то знање пренесу. Стицање у нашим школама је данас, нажалост, бијело различито.

Иако, као члан редакције, читам сваки број Хемијског Прегледа пре него што буде објављен, ради расподеле послова у редакцији, текст под насловом "Приме-

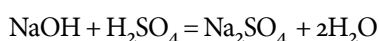
- h) За добијање овог сертификата, производ подлеже ригорозној процени и тестирању. Зелени печат се додељује производима који су ефикасни и имају незнатан утицај на животну средину, тј. задовољавају постављене еколошке стандарде (као нпр. производ мора бити нетоксичан, некорозиван и незапаљив, не сме садржавати једињења која општењу озонски омотач, мора бити формулисан без фосфата, етилен-диамин-тетрасирћетне киселине, *N,N*-бис (карбоксиметил) глицина, бутоксиетанола, нафтних дестилата, канцерогена, као и хлора).

на савремених наставних средстава у области хемије – рачунари, рачунарски програми и интернет” сам запазио тек у броју који је објављен. Тај текст ми је привукао пажњу. И ја понекад напишем текст који се бави употребом рачунарских програма у хемији. У мојим текстовима пишем о програмима за цртање дводимензионалних структура молекула, хемијских реакција, а нарочитио обраћам пажњу на тродимензионално представљање модела - како малих тако и великих молекула. Када сам текст почео да читам, да будем искрен, мало сам се разочарао - много општих тврђења и дефиниција, из тога млађи ништа да науче. Право изненађење, нажалост јако непријатно, је уследило тек негде на половини текста. Како сам даље читао текст прво што ми је напамет пало су били скичеви који су се осамдесетих и почетком деведесетих година прошлог века приказивали у Сарајевској серији “Топ листа надреалиста”, посебно део који се звао “Ђурине кућне чаролије”. Када прочитате овај текст и текст објављен у броју 2 ХП од 2012, а због чега све ово пишем, идите на интернет и погледајте:

<http://www.youtube.com/watch?v=D-B9TmO-PoXU&feature=related>^{a)}

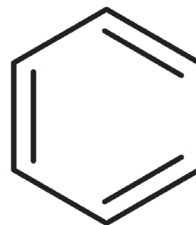
Јави те ми да ли делите моје мишљење, млађи у мојој лабораторији су се сложили.

У тексту аутор тврди да се у настави хемије могу користити програми који нису специјализовани само за хемију. Слажем се, али чему? Велика већина програма везаних за хемију, барем оних који служе за едукацију, су потпуно бесплатни и доступни су са веб страница произвођача. Добра је пракса да се млађи уче од самог почетка да такве програме користе. Свакако, избор програма зависи од наставне јединице кој се обрађује, али је одређен и “нивоом информатичког образовања наставника, и његове способности да нанаставу организује на тај начин”. Аутор даље препоручује следеће програме: Paint, Word, Power Point и Corel Draw. Ја ово и даље тешко могу да повежем са хемијом. Да не коментаришем сваку реченицу текста о коме пишем, аутор препоручује програм Paint зато што је једноставан за употребу за састављање хемијских формула и једначина хемијских реакција, зато што “дозвољава да се индекси, коефицијенти и хемијски симболи који су део хемијске формуле, могу да пишу и, у случају грешке, бришу, појединачно и независно од остатка формуле”. Ово је могуће урадити у сваком програму за обраду текста, покушајте да у текст процесору који иначе користите (нпр. Microsoft Word, или OpenOffice Writer) напишете:



Користећи само тастатуру и формирање текста употребом субскрипта. Покушајте то исто да урадите у програму Paint или било ком другом сличном програму за цртање. Даље: “Предност програма Paint огледа

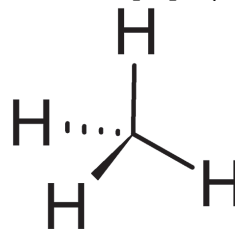
се у јасноћи приказаних структура атома и молекула.” Изгледа да наша, предходно написана, једначина није била довољно јасна. Да покушамо да нацртамо формулу бензена у програму ChemSketch (погледајте ХП 1/2008, стр. 14-20, и/или <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>). Тако нацртана структурна формула бензена је приказана на слици 1.



Слика 1. 2Д структурна формула бензена.

Да би сте је нацртали потребно је да два пута користите леви тастер миша. Покушајте сада да исту формулу нацртате у програму Paint.

Или да нацртамо структурну формулу метана који садржи sp^3 хибридоизовани атом угљеника (слика 2). Покушајте да ову слику репродукујете у програму Paint, или било ком сличном програму.



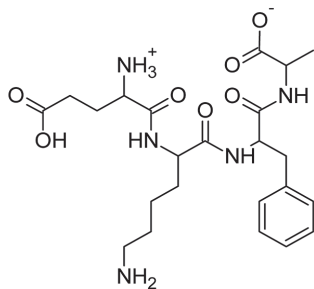
Слика 2. Структурна формула метана.

Надам се да се међу ученицима професора Милана Стојковића (аутора текста о коме пишем) неће наћи неки будући писац сатиричар. Ако се нађе, имаћемо у нашој литератури много живописнији опис предмета хемија него што је то покојном Браниславу Нушићу у његовој “Аутобиографији” пошло за руком. Додуше, у Нушићево време није било савремених средстава за учење хемије.

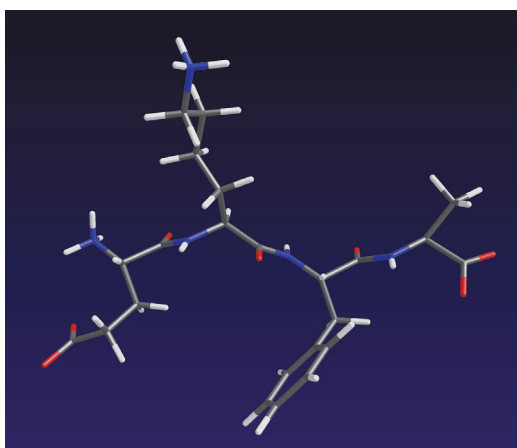
Е сада са малих, што неорганских, што органских, молекула идемо на велике – пептиде, нуклеинске киселине... Аутор препоручује да се такви молекули цртају у програму Corel Draw. Тај програм је скуп, али ако поседујете одговарајућа информатичка знања то не представља проблем. Ја сам покушао да нацртам тетрапептид (глутаминска киселина-лизин-фенилаланин-аланин) у програму ChemSketch и то изгледа као на слици 3. За то је било потребно око два минута. Исти пептид могу да ‘саставим’ употребом програма VegaZZ (програм је бесплатно доступан после регистрације, http://nova.colombo58.unimi.it/cms/index.php?Software_projects:VEGA_ZZ). Цртање 3Д структуре пептида (слика

a) Сви линкови према веб странама су функционални на дан 26. новембра 2012.

4) траје мање од једног минута. Покушајте да ове две слике репродукујете у програму Corel Draw.



Слика 3. 2Д структура тетрапептида.



Слика 4. 3Д структура тетрапептида.

Овај текст би свакако могао да буде много дужи, али да нашем читаоцу не одузима превише времена већ сам стигао до закључка (текста који коментаришем): “Негативан став према хемији и другим природним наукама постоји код ученика у целом свету. Многобројна истраживања... показала су да ученици не разумеју градиво хемије, због чега овај наставни предмет код њих изазива осећај страха и нелагоде...” Да сам ја морао да учим хемију на начин на који нам то професор Стојковић препоручује и ја бих се хемије плашио. “Главни узроци оваквог односа према хемији произи-

лазе из апстрактних појмова, сложености и апстрактности атомских и молекулских структура и процеса који се одвијају на атомском нивоу”. Ако код наших професора хемије у основним и средњим школама постигнемо да појмови и процеси везани за хемију њима не буду апстрактни, већ потпуно јасни, они ће моћи своје знање да пренесу ученицима који ће хемију учити, научити и завоleti без икаквог страха и нелагоде. Изгледа да треба да се вратимо у другу половину седамдесетих и осамдесете године прошлог века, време када је моја генерација хемију учила, научила и завоleta – од добрих професора. Због тога сам њима посветио овај текст.

Abstract

PAINT OR PAIN? A WORD ON “UTILIZATION OF CONTEMPORARY MEANS IN TEACHING CHEMISTRY-COMPUTERS, COMPUTER PROGRAMS AND INTERNET”, HP 2/2012

Branko J. DRAKULIĆ, Department of Chemistry-IC-HTM, University of Belgrade

The criticism of the text “Utilization of contemporary means in teaching chemistry-computers, computer programs and internet”, published in the ‘Hemijski Pregled’ 2/2012 is given. Along with the general statements, taken from the literature, author suggested using of general-purpose software packages for educational purposes in elementary school classes. Way in which recommended software should be used, as advised by author, could rather *distract* than attract elementary-school children in learning chemistry. Software packages made for working on the real problems in chemistry, which are free and very suitable for learning chemistry, exist. Brief comparison of elementary operations for chemical equation writing, 2D and the 3D structure representation, as recommended by the author of the text criticized, and by ACD/ChemSketch and VegaZZ are given, emphasizing senseless of the approach recommended by the author. I dedicate this text to my former professors of chemistry in elementary and secondary school, people that have been excellent educators with solid knowledge in the topic, lacking now-days contemporary tools for teaching. It is obvious that the best tool for teaching easily can be misused - this strongly depends on teacher.



ВЕСТИ ИЗ СХД



СВЕЧАНА СКУПШТИНА СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА



Председништво Српског хемијског друштва има задовољство да Вас позове да присуствујете Свечаној скупштини која се одржава поводом дана оснивања Друштва - 15. новембар 1897. године по старом календару.

ПРОГРАМ

- Порука Председништва Друштва

- Ратко Јанков, добитник Медаље за трајан и изванредан допринос науци за 2011. годину:
„Од науке ка посредовању науке”
- Уручивање годишњих награда и признања Друштва
- Ђорђе Вељовић, добитник Медаље за прегалаштво и успех у науци за 2010. годину:
„Процесирање, механичка својства и биоком-

патибилност биокерамичких материјала на бази хидроксиапатита ”

- Из историје Друштва
Свечана скупштина ће бити одржана у среду, 12. децембра 2012. године у Свечаној сали Српске акаде-

мије наука и уметности у Београду, Кнез Михаилова 35, са почетком у 11.00 часова.

Позивамо Вас и на коктел у Клубу Академије (по завршетку Скупштине).

ИЗВЕШТАЈ СА ПРВЕ КОНФЕРЕНЦИЈЕ МЛАДИХ ХЕМИЧАРА СРБИЈЕ

Прва конференција младих хемичара Србије одржана је на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду од 19. до 20. октобра 2012. године у организацији Српског хемијског друштва и Клуба младих хемичара Србије. Право учешћа имали су студенти основних, мастер и докторских студија, као и истраживачи приправници и истраживачи сарадници иновационих центара, научних института и развојних института привредних организација. Циљ конференције је била афирмација истраживања младих хемичара и њихова припрема за учешће на будућим већим конференцијама.

Учесће у раду Научног и Организационог одбора Конференције узели су млади хемичари са Универзитета у Београду, Новом Саду, Крагујевцу и Нишу. Такође, велику помоћ у организовању рада Конференције пружило је и девет студената волонтера.

Научном одбору Конференције на рецензију је послато 119 радова. Сви радови су прихваћени. Један рад на захтев аутора повучен је са Конференције, а преостали радови налазе се у књизи апстраката на компакт диску. Научни одбор радове је поделио у седам тематских области: хемијска анализа, хемијска синтеза, биохемија и биотехнологија, индустријска и примењена хемија, наука о материјалима, теоријска хемија и хемија у настави.

Као гост на Конференцији предавање је одржала Марија-Кристина Тодаска, председница *Европске Мреже Младих Хемичара* (European Young Chemists' Network - EYCN). У предавању представљен је рад ове организације која делује под окриљем *Европске Асоцијације за Хемијске и Молекуларне Науке* (EuChemS).

У оквиру научног програма одржано је пет предавања по позиву, дванаест усмених саопштења и деведесет девет постерских саопштења. На Конференцији радове су изложили сви пријављени аутори изузев Љиљане Р. Павловић, *Хемијски факултет, Универзитет у Београду*, са постером број ТХ Поб.

Предавања по позиву:

Филип Ј. Бихеловић, *Хемијски факултет, Универзитет у Београду*: Тотална синтеза (-)-атроп-абисомицина Ц.

Сања Ераковић, *Технолошко-металуршки факултет, Универзитет у Београду*: Испитивање биоактив-

ности сребра електрофоретске сребро/хидроксиапатит/лигнин превлаке у симулираној телесној течности.

Ана М. Рилак, *Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу*: Нови меридионални Ru(II)-терпиридин комплекси: синтеза, карактеризација, активациона кинетика и интеракција са дериватима гуанина.

Драган Златковић, *Депарتمان за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу*: Хемијски састав и ангиоцицелогорно дејство етарског уља биљне врсте *Ферула овина*.

Ивана З. Кузминац, *Депарتمان за хемију, Биохемију и заштитну животиње средине, Природно-математички факултет, Универзитет у Новом Саду*: Синтеза потенцијалног антипролиферативног стероидног деривата.

Један број аутора је искористио могућност да саопштења припреми на српском или енглеском језику, у форми рада на четири стране. Зборник ових радова публикован је на компакт диску као саставни део материјала Конференције.

У намери да подстакну већи број младих истраживача да у перспективи учествује у раду Конференције, Научни одбор Конференције и Српско хемијско друштво, у сарадњи са *Европском Мрежом Младих Хемичара* (EYCN - European Young Chemists' Network), обезбедили су три награде за учеснике Прве конференције младих хемичара Србије:

- Новчана награда EYCN-а за најбоље постерско саопштење - 100 ЕУР. Награђени учесник: **Миљана Р. Ђорђевић**, *Депарتمان за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу*: Хемијски састав етарског уља гомоља биљне врсте *Helianthus tuberosus* L. (Asteraceae).
- Награда за најбољи рад на 4 стране - награду је обезбедило Српско хемијско друштво у виду бесплатне чланарине (укључује претплату на часопис Хемијски преглед) и годишње претплате на *Journal of the Serbian Chemical Society* за 2013. годину. Награђени учесник: **Тамара В. Гавриловић**, *Институт за Нуклеарне Науке „Винча“*, *Универзитет у Београду*, Србија: „Ур-

conversion" луминесценција у Tm^{3+}/Yb^{3+} - $GdVO_4$.

- Награда за најбоље усмено саопштење - награду је обезбедило Српско хемијско друштво у виду бесплатне чланарине (укључује претплату на часопис Хемијски преглед) за 2013. годину. Награђени учесник: **Биљана Ђ. Глишић**,

Институт за хемију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крајевцу: Испитивање реакција монофункционалног $[M(dien)Cl]n^+$ комплекса ($M = Au(III), Pt(II)$ и $Pd(II)$) са дипептидима који садрже L-хистидин.

Игор Опсеница

ОДЛУКА О ЧЛАНАРИНИ ЗА 2013.

Поштовани,
На састанку Управног одбора Српског хемијског друштва, који је одржан 30. октобра 2012. године, донета је одлука да висина чланарине и претплата на часописе Друштва за 2013. годину остане непромењена у односу на 2012. годину:

ЧЛАНАРИНА

- за запослене 1.800 дин
- за студенте докторских студија 1.800 дин
- за професоре у основ. и сред. школама 1.000 дин
- за пензионере, студенте основних и мастер студија и незапослене 800 дин
- за чланове у иностранства 50 еура

ЈСЦС

- за запослене чланове 2.500 дин
- за чланове студенте докторских студија 2.500 дин

- за чланове пензионере, студенте основних и мастер студија и незапослене 1.000 дин
- за институције 16.000 дин
- за чланове из иностранства 50 еура
- за институције из иностранства 150 еура

ХП

- за школе и остале институције 3.500 дин
- за институције из иностранства 50 еура

Уколико сте у могућности да уплату чланарине и претплате извршите до краја ове године молимо Вас да се јавите Канцеларији Друштва ради достављања предрачуна.

Наравно, ово се не односи на чланове који су признањем или наградом СХД стекли право на бесплатно чланство и претплату за 2013. годину.

Канцеларија СХД

6. СИМПОЗИЈУМ ХЕМИЈА И ЗАШТИТА ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ

ДРУГО ОБАВЕШТЕЊЕ

Драге колеге,

Као што знате, Српско хемијско друштво организује 6. симпозијум Хемија и заштита животне средине који ће се одржати у Вршцу, хотел "Србија", 21.-24. маја 2013.г.

Наш веб сајт <http://www.envirochem2013.com> освежен је новим садржајима са подацима о темама Симпозијума,

начином регистрације и упутствима за пријаву радова.

Бићемо захвални ако ово обавештење проследите колегама, студентима и осталим потенцијално заинтересованима.

Научни и Организациони одбор
6. симпозијума Хемија и заштита животне средине

Вршац, 21.-24. маја 2013.г.

ГОДИШЊИ САДРЖАЈ (2012)

ПРИЧА СА НАСЛОВНЕ СТРАНЕ

Милош ТРАЈКОВИЋ 100 ГОДИНА ОД НОБЕЛОВЕ НАГРАДЕ ДОДЕЉЕНЕ ГРИЊАРУ И САБАТЈЕУ ЗА ОТКРИЋЕ ОРГАНСКО-СИНТЕТИЧКИХ ПУТЕВА.....	2
---	---

ЧЛАНЦИ

Татара ТОДОРОВИЋ, Ненад ФИЛИПОВИЋ Tatara TODOROVIC and Nenad FILIPOVIC НОБЕЛОВА НАГРАДА ЗА ХЕМИЈУ 2011 - КРИСТАЛИ КОЈИ ТО НИСУ БИЛИ NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY FOR 2011-DISCOVERY OF QUASICRYSTALS.....	3
Александра ЂУРИЋ Aleksandra ĐURIC ХЕРОИН HEROIN.....	9
Јелена ПОПОВИЋ-ЂОРЂЕВИЋ Jelena POPOVIĆ-ĐORĐEVIĆ ФАРМАКОЛОШКО ДЕЈСТВО ПРИРОДНИХ ИМИДА IMIDES FROM NATURAL SOURCES AS PHARMACOLOGICAL AGENTS.....	12
Иван ЈУРАНИЋ Ivan JURANIC УЗ МАЛУ ПОМОЋ СВОЈИХ ПРИЈАТЕЉА WITH THE LITTLE HELP OF MY FRIENDS.....	30
Јадранка МИЛЕТИЋ, Драгана ЂАКИЋ Jadranka MILETIĆ, Dragana ĐAKIĆ БИЈЕНЕ СМОЛЕ NATURAL RESINS.....	36
Вера ОБРАДОВИЋ Vera OBRADOVIĆ ЕЛЕКТРОСПИНИНГ ТЕХНОЛОГИЈА ELECTROSPINNING TECHNOLOGY.....	41
Наташа БОЖИЋ Nataša BOŽIĆ ХИДРОЛИЗА СИРОВОГ СКРОБА - НОВИ ПРАВЦИ COLD HYDROLYSIS OF STARCH - NEW TRENDS.....	47
Иван ГУТМАН Ivan GUTMAN ЛИВЕРМОРИЈУМ LIVERMORIUM.....	58
Снежана БОЈОВИЋ ИЗ ДНЕВНИК МАРКА ЛЕКА (1902).....	59
Драган ШКОБАЉ, Драган МАРКОВИЋ Dragan ŠKOBALJ, Dragan MARKOVIĆ КЛИМА И МИКРОКЛИМА - ТЕРМАЛНИ КОМФОР CLIMAT AND MICROCLIMAT - THERMAL COMFORT.....	64
Амра АРСЛАНАГИЋ Муратбеговић, Нина МАРКОВИЋ, Лајла БРАНКОВИЋ ХАСИЋ Amra ARSLANAGIĆ MURATBEGOVIĆ, Nina MARKOVIĆ, Lajla BRANKOVIĆ HASIĆ ФЛУОРИДИ - НАЈМОЋНИЈЕ СРЕДСТВО У ПРЕВЕНЦИЈИ ЗУБНОГ КАРИЈЕСА FLUORIDES - THE POWER IN PREVENTION OF DENTAL CARIES.....	70
Даница МИЛОЈКОВИЋ, Тајјана АНЂЕЛКОВИЋ, Гордана КОЦИЋ Danica MILOJKOVIĆ, Tajjana ANĐELKOVIĆ, Gordana KOCIĆ ФТАЛАТИ - ИЗВОРИ, ИЗЛУЖИВАЊЕ, ДЕГРАДАЦИЈА, ОДРЕЂИВАЊЕ, ТОКСИЧНОСТ, ЛЕГИСЛАТИВА PHTHALATES - SOURCES, LEACHING, DEGRADATION, DETERMINATION, TOXICITY AND LEGISLATION.....	86
Ерне Е. КИШ, Горан Ц. БОШКОВИЋ Erno E. KISS and Goran C. BOŠKOVIĆ ПРЕГЛЕД РАЗВОЈА ИНДУСТРИЈСКЕ КАТАЛИЗЕ OVERVIEW OF THE DEVELOPMENT OF INDUSTRIAL CATALYSIS.....	91
Воин ПЕТРОВИЋ Voин PETROVIĆ СЕСКВИТЕРПЕНИ - ОДАБРАНЕ СТРУКТУРЕ КАО НОСИОЦИ БИОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ SESQUITERPENES - SELECTED STRUCTURES WITH BIOLOGICAL ACTIVITY.....	114
Биљана С. МАЛУЦКОВ Viļjana S. MALUCKOV БИОФИЛМОВИ И КОРОЗИЈА ЧЕЛИКА BIOFILMS AND CORROSION OF STEEL.....	119
Романа МАСНИКОСА Romana MASNIKOSA ОДРЕЂИВАЊЕ СТРУКТУРЕ ГЛИКАНА: ПОЈАМ, ЗНАЧАЈ И ПРИПРЕМА УЗОРКА ЗА АНАЛИЗУ DETERMINATION OF GLYCAN STRUCTURE: INTRODUCTION, IMPORTANCE AND SAMPLE PREPARATION FOR THE ANALYSIS.....	123
Ана МИЈУШКОВИЋ, Михајло Б. СПАСИЋ Ana MIJUSKOVIĆ, Mihaјlo B. SPASIC РЕЦЕПТОРИ СПРЕГНУТИ СА G ПРОТЕИНИМА - НОБЕЛОВА НАГРАДА ЗА ХЕМИЈУ 2012. THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY 2011. FOR STUDIES OF G - PROTEIN COUPLED RECEPTORS.....	142
Милена ЧАВИЋ Milena ČAVIĆ УЛОГА БЕЛИЈСКОГ СТАРЕЊА У РАЗВОЈУ И ТЕРАПИЈИ МАЛИГНИХ ОБОЉЕЊА THE ROLE OF CELLULAR AGING IN THE DEVELOPMENT AND TREATMENT OF MALIGNANT DISEASES.....	147
Романа МАСНИКОСА Romana MASNIKOSA	

ТЕХНИКЕ ЗА ОДРЕЂИВАЊЕ СТРУКТУРЕ ГЛИКАНА TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF GLYCAN STRUCTURE.....	152
Наташа ПЕЈИЋ N. PEJIC ЗЕЛЕНА ПРИЧА О АЛКИЛ ПОЛИГЛИКОЗИДИМА GREEN STORY ABOUT ALCYL POLYGLYCOSIDES.....	158

ТРИБИНА

Иван ГРЖЕТИЋ, Иван ЈУРАНИЋ, Љиљана ДАМЈАНОВИЋ, Ивanka ПОПОВИЋ, Ивана ИВАНЧЕВ ТУМБАС, Зоран МАТОВИЋ, Тајјана АНЂЕЛКОВИЋ, Љубица ДИКОВИЋ, Милан АНТОНИЈЕВИЋ РЕФЕРЕНТНИ ОБРАЗОВНИ СТАНДАРДИ ЗА ХЕМИЈУ И СРОДНЕ ДИСЦИПЛИНЕ.....	99
Бранко Ј. ДРАКУЛИЋ СРПСКИ ЦИТАТНИ ИНДЕКС - ПИТАЊА И ОДГОВОРИ.....	130
Перо ШИПКА ТРИ ОДГОВОРА, ДВЕ ТАБЕЛЕ И ЈЕДНА ПОНУДА: ПОВОДОМ БЕЛЕШКЕ Б.Ј. ДРАКУЛИЋА "СРПСКИ ЦИТАТНИ ИНДЕКС - ПИТАЊА И ОДГОВОРИ".....	131

ХЕМИЈА У ШКОЛИ

Василије ПЛАНИЋ и Марија ЗЕЧЕВИЋ Vasilje PLANIĆ and Marija ZEČEVIĆ ПЕРИОДНИ СИСТЕМ ЕЛЕМЕНАТА PERIODIC TABLE OF THE ELEMENTS.....	17
ПРАВИЛНИК ЗА ТАКМИЧЕЊЕ ИЗ ХЕМИЈЕ УЧЕНИКА ОСНОВНИХ ШКОЛА ЗА ШКОЛСКУ 2011/2012. ГОДИНУ.....	22
Милан СТОЈКОВИЋ Milan STOJKOVIĆ ПРИМЕНА САВРЕМЕНИХ НАСТАВНИХ СРЕДСТАВА У ОБЛАСТИ ХЕМИЈЕ - РАЧУНАРИ, РАЧУНАРСКИ ПРОГРАМИ И ИНТЕРНЕТ UTILIZATION OF CONTEMPORARY MEANS IN TEACHING CHEMISTRY- COMPUTERS, COMPUTER PROGRAMS AND INTERNET.....	51
48. РЕПУБЛИЧКО ТАКМИЧЕЊЕ ИЗ ХЕМИЈЕ ЗА УЧЕНИКЕ ОСНОВНИХ ШКОЛА.....	76
XIVIII РЕПУБЛИЧКО ТАКМИЧЕЊЕ ИЗ ХЕМИЈЕ УЧЕНИКА СРЕДЊИХ ШКОЛА.....	77
Селена СЛИМИЋ, Алекса СЛИМИЋ, Слађана МИТИЋ Selena SLIMIĆ, Aleksa SLIMIĆ, Slađana MITIĆ ЖВАКАБА ГУМА - ЗАДОВОЉСТВО ИЛИ ПОТРЕБА CHEWING GUM - JUST PLEASURE OR USEFUL TO CONSUMERS?.....	105
САОПШТЕЊЕ РЕПУБЛИЧКЕ КОМИСИЈЕ ЗА ТАКМИЧЕЊЕ ИЗ ХЕМИЈЕ ЗА УЧЕНИКЕ ОСНОВНИХ ШКОЛА.....	110
САОПШТЕЊЕ РЕПУБЛИЧКЕ КОМИСИЈЕ ЗА ТАКМИЧЕЊЕ ИЗ ХЕМИЈЕ ЗА УЧЕНИКЕ СРЕДЊИХ ШКОЛА.....	110
ИЗВЕШТАЈ О ОДРЖАНОМ ПРОГРАМУ СТРУЧНОГ УСАВРШАВАЊА НАСТАВНИКА ХЕМИЈЕ: АПРИЛСКИ ДАНИ ПРОСВЕТНИХ РАДНИКА СРБИЈЕ.....	110
Иван ГУТМАН, Јелена ЂУРЂЕВИЋ, Драгана ТРИВИЋ Ivan GUTMAN, Jelena ĐURĐEVIĆ, Dragana TRIVIĆ ЕФИКАСНОСТ НАСТАВЕ ХЕМИЈЕ - ИСТИНЕ И ЛАЖИ EFFICIENCY OF TEACHING OF CHEMISTRY - TRUTH AND LIES.....	135
Бранко Ј. ДРАКУЛИЋ Branko J. DRAKULIĆ БОЛНО УЧЕЊЕ ХЕМИЈЕ САВРЕМЕНИМ НАСТАВНИМ СРЕДСТВИМА PAINFUL OR PAIN? A WORD ON "UTILIZATION OF CONTEMPORARY MEANS IN TEACHING CHEMISTRY-COMPUTERS, COMPUTER PROGRAMS AND INTERNET", HP 2/2012.....	164

ХЕМИЈА НА ИНТЕРНЕТУ

Александар ДЕКАНСКИ, Владимир ПАНИЋ, Драгана ДЕКАНСКИ http://www.researcherid.com.....	137
---	-----

БЕЛЕШКЕ

ПРИКАЗ УЏБЕНИКА.....	138
----------------------	-----

ВЕСТИ ИЗ СХД

IN MEMORIAM Професор ФЕРЕНЦ Ф. ГАЛ (1941-2011).....	25
ИЗВЕШТАЈ СА СВЕЧАЊЕ СКУПШТИНЕ СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА.....	26
ЧЛАНАРИНА И ПРЕТПЛАТА ЗА 2012. ГОДИНУ.....	28
ИЗВЕШТАЈ О РАДУ СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА У 2011. ГОДИНИ.....	79
ИЗВЕШТАЈ О РАДУ ЈУБИЛАРНОГ 50. САВЕТОВАЊА СХД И ОБЕЛЕЖАВАЊУ 115 ГОДИНА СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА.....	111
КОНКУРС ЗА НАГРАДЕ И ПРИЗНАЊА СХД У 2012. ГОДИНИ.....	112
УСПЕШНО ПРВО УЧЕШЋЕ СРБИЈЕ НА МЕЂУНАРОДНОЈ ХЕМИЈСКОЈ ОЛИМПИЈАДИ.....	139
СВЕЧАНА СКУПШТИНА СРПСКОГ ХЕМИЈСКОГ ДРУШТВА.....	166
ИЗВЕШТАЈ СА ПРВЕ КОНФЕРЕНЦИЈЕ МЛАДИХ ХЕМИЧАРА СРБИЈЕ.....	167
ОДЛУКА О ЧЛАНАРИНИ ЗА 2013.....	168
6. СИМПОЗИЈУМ ХЕМИЈА И ЗАШТИТА ЖИВОТНЕ СРЕДИНЕ.....	168