

NAUČNO DRUŠTVO NR BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA IX

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 5



Sarajevo

1958

ALEKSANDAR SABOVLJEV, ALEKSANDAR BEČAREVIĆ, LIDIJA MIK-KOVIĆ i ALEKSANDAR FAJGELJ

ISPITIVANJE METABOLIZMA FOSFORA U JETRI PACOVA POMOĆU RADIOFOSFORA

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 14. I. 1958. g.)

UVOD

Problematika i program rada

Eksperimentalni rezultati koji će biti izneseni u ovom radu dali su povoda jednom od autora ove publikacije da pokuša primeniti Guldber-Waageov zakon o delovanju aktivnih masa na lančaste i ireverzibilne nizove reakcija metabolizma IN VIVO. Teoretska razrada tog problema objavljena je u posebnom saopštenju (17). U tome radu su izvedene odgovarajuće principijelne formule za izračunavanje specifičnih i faktičnih brzina sinteza i razlaganja jedinjenja, koja u lančastom reakcionom nizu učestvuju kao intermedijerni posrednici u prenošenju nekog hemijskog radikala (u našim eksperimentima prenošena je fosforna kiselina). Isto su tako izvedene formule pomoću kojih je moguće izračunati i »koncentracije« posredničkih supstacija iz poznatih vrednosti za specifične brzine sinteza i razlaganja, s obzirom da se »koncentracije« jedinjenja (između prenosilačke supstance i radikala koji se prenosi) neprekidno iznova formiraju (i rasturaju) u lančastom nizu, pri čemu su uslovljene proporcijom između specifične brzine sinteza i specifične brzine razlaganja datog spoja, kao i veličinom transporta.

U prvom delu ove publikacije prikazan je najpre čitavi tok eksperimentalnog rada, a zatim rezultati ispitivanja metabolizma fosfora u jetri pacova, što je ujedno osnovni problem ovog saopštenja. Pored osnovnih ispitivanja, izvršene su još i tri grupe dopunskih analiza, koje su tako isto opisane u prvom delu.

U drugom i trećem delu ovog saopštenja učinjen je pokušaj da se iz proporcija raspodele fosfora, iz izračunatih brzina sinteza i razlaganja, kao i iz vremena potrebnog da se postigne ravnoteža prenošenja fosfora u pojedinoj frakciji, utvrdi reakcioni poredak po kome se vrši prenošenje fosforne kiseline (u daljem izlaganju: fosfora). U tu svrhu su principijelne formule iz pomenutog saopštenja (17) najpre upotrebljene za izračunavanje konkretnih specifičnih brzina (sinteza i razlaganja), kao i stvarnih aktuelnih brzina (kojima su reakcije ostvarene u našim eksperimentima u raznim vremenskim periodima).

U savremenoj literaturi o metabolizmu fosfora u jetri (u meri u kojoj nam je bila pristupačna) nismo mogli naći informacije da su do sada i drugi autori tom problemu pristupali kao jedinstveno tekućem procesu, po principu otvorenih sistema, odnosno kao neprekidno tekućem lančastom reakcionom nizu. To međutim ne znači da smo problemu pristupili sa gotovim ubedenjem da ćemo metabolizam fosfora u jetri pacova »a priori« tretirati kao lančasti reakcioni niz. Naša je pretpostavka bila samo u tome da je takav lančasti niz principijelno moguć, kao što je moguć i drugi sistem reakcija. Kako u stvari metabolizam teče, to moraju otkriti eksperimentalni rezultati, a ne naše pretpostavke. Šta će eksperimenti otkriti, zavisi i od metode kojom se oni organizuju i od načina kako se izvode. Odlika našeg prilaženja eksperimentima je u tome da je ono omogućilo da se činjenice proticanja kroz lančasti niz otkrivaju, ukoliko postoje. Ako takav poredak DE FACTO postoji, on se u eksperimentima mora ispoljiti. Kada analiza ne utvrdi postojanje elemenata reakcionog poretka, uzrok se može nalaziti na dve strane: 1) ne postoji sam poredak; — 2) metoda nije sposobna da poredak otkrije. Ako objektivno ne postoje činjenice reakcionog poretka, tada nikakva metoda neće biti u stanju da ih otkrije. Opasnost potiče od metoda koje kao takve nisu sposobne da obuhvate svojim analizama elemente poretka.

Mada smo možda prvi pristupili analizi metabolizma fosfora u jetri na takav način, principijelni metod takvog prilaženja otkrili su i razradili mnogi istraživači. Danas postoji već snažan pokret u savremenoj biologiji, čiji pripadnici živi organizam proučavaju metodom za otkrivanje elemenata tekućeg otvorenog sistema. Karakteristični su nalazi i zaključci nekih poznatih savremenih biologa i biohemičara (Bertalamffy, Hartmann, Prigogine i mnogi dr.) (3. 14), koji organizmu prilaze kao otvorenom tekućem lančastom sistemu, te tvrde da je metabolizam, uopšte uzev, moguće do kraja sagledati jedino ako se proučava IN VIVO, gde se on odigrava kao ireverzibilno tekući otvoreni lančasti proces. Prema nalazu tih autora, čak i kada bi se sve pojedinačne reakcije metabolizma proučile kao izolovane pojave, nikada ne bismo sagledali čitavi mehanizam metabolizma kao celinu kakav je IN VIVO, gde on teče kao jedinstvena reka. Ovi autori čak zastupaju gledište da će SAMO izučavanje otvorenih procesa lančastih nizova tekućeg metabolizma omogućiti biologiji da napusti DESKRIPTIVNI metod, koji prema njihovom mišljenju još uvek dominira u mnogim područjima biologije, te ga zameni KAUZALNIM metodom, koji jedini može otvoriti put za formulaciju bioloških pojava i zbivanja u obliku prirodnih zakonitosti, analogno onome što već rade fizika, hemija i astronomija (3). Prema mišljenju pomenutih autora, ovakvo tretiranje metabolizma dovodi do otkrivanja novih specifičnih činjenica i pojava, koje inače nije moguće uočiti kada se biološke reakcije analizuju pojedinačno IN VITRO, odnosno kada se saznaju kao izolovane pojave u zatvorenom sistemu. Čak se i koncepcije o mehanizmu metabolizma, o njegovom mestu i ulozi u organizmu (odnosno u funkcionalnom poretku organizma), o njegovom značenju kao »baze« za izvršavanje funkcija organa, — moraju temeljito prilagoditi principu lančastog poretka metaboličnih reakcija.

Mada su biolozi bili prvi koji su problem otvorenih ireverzibilnih lančastih procesa stavili na dnevni red naučnih proučavanja, ipak danas više nisu usamljeni. Premda je još pre 10 godina Bertalamffy tvrdio (3)

da fizika i hemija još nemaju interesa da napuste sistem zatvorenih procesa, prema mišljenju redaktora ruskog prevoda De Grootove monografije (8) metod proučavanja otvorenih sistema u mnogim područjima fizike i hemije doživio je tokom poslednje decenije svoje završno uobličenje, blagodareći osobito radovima belgijskih i holandskih istraživača (pre svega Onsagera, Dondea, Prigoginea, Defaya, De Groota, kao i dr.) (8).

Ovaj savremeni pokret u biologiji, fizici i hemiji dao nam je potstrek i hrabrost da proučavanju metabolizma u jetri pacova pristupimo na nov način, te da u njemu pokušamo tražiti elemente koji bi nas informisali da li je sazdan po principu otvorenog lančastog ireverzibilnog sistema. Ukoliko te elemente dobijemo iz eksperimenata, bićemo možda u mogućnosti da izvršimo rekonstrukciju i samog lančastog poretka toga metabolizma. Razume se, osim toga moramo prikupiti i sve podatke o tipovima reagovanja, o vrstama hemijskih spojeva, o njihovim »koncentracijama«, itd. Baš upotreba radioizotopa kao indikatora, otvara nam perspektivu da sagledamo i podatke koje nam obična hemijska analiza ne bi mogla otkriti u tekućem lančastom nizu metaboličnih reakcija.

Naročito jak potsticaj za istraživanje ovakvog tipa dali su nam, pored ostalog, i ekaperimentalni rezultati autora koji su metabolizam proučavali pomoću radioaktivnih izotopa. Mada primene radioizotopa kao indikatora za proučavanje metabolizma nisu uvek davale povoda njihovim primenjivačima da donose zaključke o prirodi i tipu organizacije metabolizma, ipak su osobito radovi Schoenheimera (20), Borsooka (4) i Keighleya (12) vrlo instruktivni baš u tom pogledu. Naime, iz njihovih radova izvučeni su zaključci da se aminokiseline (posle unošenja u organizam putem hrane) prenose određenim redosledom kroz niz raznih organa, ulazeći sukcesivno u strukture proteina iz kojih su izgrađene ćelije tih organa (22).

Metabolizam kao osnovni, odnosno kao filogenetski i ontogenetski najstariji mehanizam života ustrojen je dakle prema gledanju mnogih savremenih autora po principu jedinstvenog, otvorenog i ireverzibilnog lančastog procesa (3, 14). Ova bi se činjenica morala na određeni način ispoljiti i u svakom pojedinom organu visokodiferenciranog organizma kičmenjaka, odnosno u njegovim pojedinačnim ćelijama. Očekivali bismo da će i svaka molekula metabolita, sa svoje strane, takode slediti pomenuti princip, te će prema tome prolaziti kroz specifični lančasti niz sukcesivno poredanih pojedinačnih reakcija metabolizma (17). To bi konkretno značilo da svaka vrsta metabolita određenim redom reaguje sa nizom molekula sasvim definisanih vrsta drugih supstancija. Pri tom data vrsta trpi sukcesivne transformacije od partnerskih molekula, sa kojima reaguje (pri čemu se i partnerski molekuli na recipročan način preobražavaju), pretvarajući se zakonitim redom u niz novih specifičnih molekulskih struktura, koje bismo mogli zamisliti kao redosledne »molekulske generacije«. Postavlja se pitanje da li se sve sukcesivne transformacione reakcije odigravaju na jednom jedinom linearnom putu, kada jedna matična vrsta molekula uzastopno reaguje sa dužim nizom drugih vrsta? U principu nije nemoguće da se početne generacije neke molekulske loze uključuju u nekoliko tipova transformacionih linija, dajući uporedo više smerova heterogenih nizova molekulskih generacija. Bilo bi isto tako moguće očekivati da će reakcije preobražaja neke molekulske vrste biti organizovane samo na jednoj liniji. Obe mogućnosti mogu biti kombi-

novane, tj. da molekuli date vrste samo u početnim preobražajima idu najpre po jedinstvenoj liniji preobražavanja, da bi se zatim njihove transformacione putanje razgranale; ali se i obratno posebne preobražajne linije poslednjih generacija sasvim heterogenih molekulskih loza mogu pri kraju transformacionih putanja stopiti u zajedničku završnu liniju, itd. Najzad moguće je očekivati i kružno vraćanje dela molekula iz kasnijih reakcionih stupnjeva u neke ranije.

U programu istraživanja migracionih puteva za pojedine molekulske loze kroz životinjski organizam nameću se u najmanju ruku sledeći problemi: 1) utvrditi prirodu lančastog niza metabolizma date molekulske loze (jednostavni linearni lanac; razgranati lanac; iz više loza sažeti lanac; lanac sa retrogradno tekućim molekulama; itd.); — 2) ustanoviti da li se lanac započinje, a ujedno i završava, u ćelijama istog organa, ili se odigrava u interorganskim razmjerama i etapama; — 3) ispitati kako deluju metaboliti na funkcionalnu aktivnost organa, čiji ih metabolizam specifično transformiše. Problemi iz tačke 1 i 3 već su 8 godina predmeti proučavanja u laboratorijama Fiziološkog instituta Medicinskog fakulteta u Sarajevu, a do sada su saopštene tri publikacije sa temama iz tih problema (17, 18, 19).

Centralni zadatak ovog rada odnosi se na proučavanje migracije radiofosfornih jedinjenja u jetri pacova. U tom okviru pojavljuju se sledeći pojedinačni zadaci: a) utvrditi sa kojim se organskim jedinjenjima i u kojim količinama spaja fosforna kiselina; — b) pokušati utvrditi reakcioni poredak po kome se vrše reagovanja fosforne kiseline (fosfata, ili sasvim kratko rečeno fosfora) sa tim vrstama organskih jedinjenja: da li se reakcije odigravaju između neorganskog fosfata i svake organske materije posebno, ili se reakcija vrše po nekom lančastom sistemu; — c) najzad, bilo bi poželjno utvrditi da li neki od organskih fosfornih spojeva posle nastavka napušta jetru, odnosno kakva mu je sudbina posle toga (napr. da li se uključuje u metabolizme drugih organa, itd.).

Za rešenje ovog centralnog problema bilo je potrebno najpre ustanoviti određene uslove i situacije prometa i raspodele radiofosfora u celom organizmu, kao i u određenim organima pacova. Pokazaćemo da su neki od podataka delom već bili utvrđeni u istraživanjima drugih autora, ali je ipak bilo potrebno da većinu od tih činjenica sami dopunimo, a neke i eksperimentalno da proverimo. Stoga se ovaj rad može okvalifikovati kao kompleksni eksperimentalni poduhvat u kome je sarađivao tim istraživača, jer se mnogostrukost problema, koje je trebalo simultano proučavati na svakoj životinji, nije mogla drugačije rešiti. Eksperimenti su izvedeni u četiri serije (peta je započeta, ali je prekinuta, te je ostala nedovršena). U prvom delu problem je raščlanjen na četiri posebna eksperimentalna zadatka, koji bi se možda mogli i svaki za sebe istraživati i publikovati, ali su ovde obuhvaćeni kao jedinstvena tematika.

U drugom i trećem delu obuhvaćena su četiri osnovna teoretska problema.

Posebna proučavanja u eksperimentalnom delu obuhvataju sledeće teme:

I — Kvantitativni promet i bilans (unošenje — iznošenje) veštačkog radiofosfora u organizmu pacova tokom eksperimenta.

II — Raspodelu veštačkog radiofosfora u tri eksperimentalna područja, (proučavanjem količine radiofosfora u neorganskim funkcijama fosfora u jetri, krvi i ekskrementima).

III — Kretanje veštačkog radiofosfora kroz sisteme organskih jedinjenja u jetri (centralna problematika rada).

IV — Raspodelu prirodnog neradioaktivnog fosfora u fosforovim frakcijama u jetri.

U program rada spada i niz pomoćnih tehničkih radnji, koje je nužno izvršiti pre i tokom eksperimenta.

U programu istraživačkog rada pored čisto eksperimentalnih, ulaze još i druge vrste analitičkih poduhvata, što sačinjava sadržinu drugog i trećeg dela ovog rada. Pre svega, svim rezultatima eksperimentalne analize potrebno je dati pogodno računске, grafičke forme i dr., te izvršiti odgovarajuća upoređenja, analize, itd. Druga grupa zadataka obuhvata pokušaj da se kretanja radiofosfora proanalizuju sa stanovišta poznatih zakona hemije. Glavni zadatak biće pokušaj iznalaženja reakcionog poretka, kojim veštački radiofosfor (pa prema tome i čitavi prirodni fosfor) jetre stupa u reakcije sa organskim jedinjenjima u jetri pacova. Najzad će biti proučen odnos između transportne i akumulacione uloge frakcije u lancu.

Pošto je eksperimentalni deo rada bio protegnut na blizu četiri godine, učesnici u radu su se delom smenjivali. Tako su u prvim dvema serijama učestvovali A. Sabovljević, A. Bećarević i L. Micković. U trećoj seriji učestvovali su A. Sabovljević i L. Micković, dok su u IV eksperimentalnoj seriji učestvovali uglavnom A. Sabovljević i A. Fajgelj. Drugi i treći (teorijski) deo ove publikacije obradio je A. Sabovljević.

Pokušali smo za našu problematiku pronaći podatke i u radovima drugih autora (u literaturi). Specijalno nas je zanimalo šta je do sada objavljeno u pogledu ispitivanja reakcionog poretka. Nismo imali sreću da nađemo nešto određenije u tom pogledu. Najobilnije informacije o kretanju radioaktivnog fosfora u organizmu pacova našli smo kod Hevesya (10), koji u velikoj monografiji citira veliki broj sopstvenih i tuđih ispitivanja. Mada nigde nije definisano, iz načina izlaganja se vidi da i Hevesy i autori koje citira analiza nisu vršili sa zadatkom da proučavaju pitanje reakcionog poretka. Ponegde se dobije utisak da autori uzimaju da je »a priori« već bilo poznato da neorganski fosfor reaguje sa svakom vrstom organskih spojeva u jetri. Dok je za te autore glavno bilo utvrditi posebne činjenice, za nas će glavni zadatak biti da uporedo sa posebnim činjenicama pokušamo tražiti reakcioni poredak vezivanja fosfora sa organskim spojevima jetre. Ne želimo »a priori« zauzeti stav u prilog kog bilo reakcionog poretka, ali smo protiv toga da se reakcije posmatraju odvojeno od celine, ako nije izričito dokazano da tako teku. Znači da će nam zadatak biti da ispitujemo koje se reakcije vrše nezavisno od drugih, a koje možda u povezanim lancima. Uzimamo kao glavno: postaviti zadatak da se traži reakcioni poredak. Kada je takav problem postavljen, analiza mora startovati da ga traži i utvrđuje u činjeničnom materijalu, ali istovremeno mora biti obezbeđeno da analiza ne prejudicira niti njegovo postojanje, niti prirodu njegovu (kao što ne sme poći ni od pretpostavke da poretka u reagovanju nema). Smatramo da zadatak nije do kraja izvršen ako samo utvrđujemo odvojene činjenice kao takve, a za-

nemarujemo poredak u kome su ugrađene. Značaj radioaktivnih izotopa sastoji se baš u tome što omogućuje prilaženje, a nadamo se i rešavanje problema ove vste.

U naučnoj literaturi već je dobro poznat slučaj linearnog prenošenja fosfora (fosfatnih molekula) u mišiću posredstvom nekoliko utvrđenih posrednika (fosfopirogroždana kis. kreatinsforna kis. adenozintrifosforna kis., itd.). Takode je poznato da se putem transporta fosforne kiseline preko ovog lanca vrši prenošenje energije mišićnog rada sa sistema šećera na sistem miozina. Postavlja se pitanje da li i u jetri postoji analogan mehanizam za prenošenje energije. Za istovetni lanac kakav je ustanovljen u mišićima, jetra neposедуje dva člana: 1) u njoj nema miozina, te se taj smer prenošenja ne može obavljati; 2) u jetri nema ni kretainfosforne kiseline, te ova u jetri ne može fungirati kao posrednik ni u kakvom lancu prenošenja (16).

Prema Hevesyju (10), količina organski vezanog fosfora u jetri pacova raste uporedo sa unošenjem veće količine šećera (dok takav efekat ne nastaje ako se u hrani poveća količina masti ili proteina). Ipak, kod nekih tipova blokada šećernog metabolizma ne javlja se inhibicija i u metabolizmu fosfolipoida (10). Hevesy dalje citira podatke uzete od Chagraffa i Kestona (6), prema kojima lecitin u jetri biva preobražen u kefalilin putem demetilacije njegove holinske komponente. Ovde se, dakle, ne radi o pravom transportu fosfata, već o preobražaju organskog nosioca fosforne kiseline. Stoga za našu problematiku verovatno neće biti od neposrednog interesa da pratimo seobu fosfora unutar grupe lipoida. Zanimljiv je Hevesyjeva podatak da se kod pacova tokom svakog sata oko 1% proizvedenih fosfolipoida (raznih tipova) eliminiše u krv, odlazeći odatle brzo u druge organe.

Vredne su pažnje informacije (5) da proizvodnja ribonukleinske kiseline u citoplazmi (a možda i u jedarcu?) teče uporedo sa sintezom proteina. Tako napr. prema nalazima Spiegelmana i Kamena (21) u kvascu koji se gaji na hranjivoj podlozi bez sirovina potrebnih za sintezu proteina, a sa dovoljno šećera, vrenje će biti vrlo intenzivno, ali se gljivice ne mogu razmnožavati. Pritom je ukupni promet fosfora velik, dok je istovremeno promet posebnog fosfora nukleinskih kiselina skoro potpuno zaustavljen. Ako se pak ovoj kulturi doda neka od amonijevih soli, promet fosfora nukleinskih kiselina naglo raste, a uporedo sa tim nastaje upadljivo razmnožavanje kvašćeve gljivice. Nadeno je (5) dalje da ribonukleinska kiselina igra važnu ulogu (možda kao sirovina) u sintezi deoksiribonukleinske (tj, timonukleinske) kiseline. Primećeno je da se za vreme mitoze smanjuje količina ribonukleinske kiseline u citoplazmi, dok se istovremeno znatno povećava količina timonukleinske kiseline u jedru (5). Pretpostavlja se (5) da u tome procesu komponente ribonukleinske kiseline (možda i fosforna kiselina?) prelaze u strukturu timonukleinske kiseline. Pritom je ostalo nerazjašnjeno da li najpre dolazi do potpunog razlaganja ribonukleinske kiseline do stupnja monomernih sastojaka, ili se čitavi mononukleotidi ribonukleinske kiseline ugrađuju u strukturu timonukleinske kiseline (5). Nije dalje poznato ni kakva je kasnija sudbina timonukleinske kiseline, tj. njenih sastojaka, mada je poznato da se u većini organa i njeni sastojci neprekidno obnavljaju (ali ne i u eritrocitima ptica) (5).

Ako sumiramo podatke pronađene u literaturi, vidi se da ni izdaleka ne pružaju zadovoljavajuće odgovore na pitanje postavljeno u našem zadatku. Iz tih se podataka ne može stvoriti slika o reakcionom poretku u metabolizmu jetrinog fosfora. To nas je još više potstaklo da pristupimo našim eksperimentima. Šta ćemo preko rezultata naših eksperimenata postići u rešavanju tog pitanja, videćemo na kraju izlaganja. Ako nam pode za rukom makar da ovo pitanje samo pokrenemo sa mrtve tačke, smatramo da je to uspeh.

I D E O

IZVOĐENJE EKSPERIMENATA

A — EKSPERIMENTALNA TEHNIKA I METODI RADA

Rešavanju postavljenog pitanja poretka reagovanja fosforne kiseline sa organskim komponentama u jetri pacova pristupili smo u četiri dovršene eksperimentalne serije (i u jednoj nezavršenoj), primenivši radiofosfor P^{32} kao indikator za proučavanje tog problema. Biće izloženi rezultati od 87 ispitanih pacova, dok podaci od četiri pacova iz pete serije neće biti obuhvaćeni.

Prve dve serije eksperimenata izvedene su u biološkom odeljenju Instituta za nuklearne nauke »Boris Kidrič« u Vinči*), u periodu maj-juli 1952 godine, a ostale serije u laboratorijama Fiziološkog instituta Medicinskog fakulteta u Sarajevu (III serija u periodu januar—april 1954, a IV i početak V serije u vremenu od oktobra 1954 do marta 1955 god.). Prva eksperimentalna serija obuhvatila je 19 muških belih pacova, druga 24 pacova, dok su treća četvrta i peta obuhvatile: 24, 20 i 4 muška bela pacova.

Rad sa svakom serijom životinja odvijao se u nekoliko sukcesivnih etapa. Najpre su za svaku seriju odabrane pogodne životinje, te izolovane u posebno pripremljene levkove, osposobljene za sakupljanje ekskremenata. Životinje su pre toga izmerene, a upotrebljene su one sa približno jednakim težinama. Svim životinjama je peroralno data podjednaka doza radiofosfora P^{32} (ok 10 mikrokirija svakom pacovu). Kada je trebalo analize vršiti u kratkim vremenskim razmacima, aktivitet je dat istog dana onom broju koji je u datom vremenu mogao biti obuhvaćen analitičkom procedurom eksperimenata. Životinje koje su već primile radiofosfor držane su u pomenutim levkovima u posebnoj prostoriji.

Pošto su izvršene opisane pripreme pacova, pristupilo se uzimanju materijala za analize. Eksperimenti su sabirani svakog dana u satu u kome je nultog dana dat radiofosfor. Uzimanje krvi i jetre bilo je uslovljeno žrtvovanjem životinja. Žrtvovanje je izvršeno u tačno određenom satu pod narkozom. Kod životinja od kojih je analizovana i radioaktivnost krvi, ova je uzimana pre ekstirpacije jetre, kako se prilikom njenog vađenja ne bi izgubila krv.

*) Zahvaljujemo Naučnom savetu i upravi instituta za nuklearne nauke »Boris Kidrič«, u Vinči, a posebno akademiku dr. Pavlu Saviću, što su našoj ekipi odobrili da prve dve serije eksperimenata sa radiofosforom izvrši u biološkoj laboratoriji toga Instituta.

Kada je iz životinje uzet materijal, odmah je podvrgavan daljim pripremnim procedurama za merenje. Iz krvi je odvajan neorganski fosfor, čija je radioaktivnost merena kasnije. Iz jetre su odvajane sve fosforne frakcije (izuzev propandiol-fosfata). Bilo je potrebno blokirati sve procese metabolizma u jetri u trenutku njenog vadenja, jer su neke fosforne frakcije veoma kratkotrajnog veka, te bi brzo iščezle iz jetre ako se u njoj ne bi trenutno blokirao promet materija. Blokiranje je vršeno ubacivanjem jetre u tečni vazduh (temp. — 180) u trenutku ekstirpacije (koliko je moguće brže). Ovde se jetra u najkraćem vremenu potpuno smrznula, te su sve metabolične reakcije trenutno prekinute.

Nakon mržnjenja jetre, pristupano je njenom merenju na analitičkoj vagi. Čim je izvađena iz tečnog vazduha, jetra je prenesena u smrznutom stanju u staklenu posudicu za merenje, gde je poklopcem zaštićena, da ne bi onako hladna za sebe kondenzovala vodenu paru. Zatim je odvojen komadić jetre za kontrolnu analizu celokupnog fosfora u jetrinom tkivu. Obično je uziman komadić težine ispod pola gr., tj. manje od 5% jetrine težine.

Čim su gravimetrijska merenja organa bila završena, pristupilo se izolaciji fosfornih frakcija iz jetre, primenom odgovarajućih hemijskih procedura za tu svrhu. Sukcesivno su upotrebljene tri metode za ekstrakovanja. Najpre je izvršena ekstrakcija grupe fosfornih jedinjenja, koja se u vidu pravih rastvora rastvaraju u kiseloj sredini (acidsolubilne frakcije). Nakon ove ekstrakcije izvodi se dalje pojedinačno izdvajanje frakcija iz zajedničkog rastvora. Posle kisele ekstrakcije vrši se nova ekstrakcija iz ostatka tkivne kaše pomoću organskih rastvarača (eter, alkohol, kloroform), u kojima se rastvaraju masne supstancije. Nas doduše zanimaju fosfolipoidi, ali oni se ovom procedurom ekstrahuju zajedno sa drugim masnim supstancijama. Iz ekstrakta se kasnije izoluje fosfor koji je bio vezan za fosfolipoide. Novi preostatak tkivne kaše upotrebljen je posle ekstrakcije masti za izolovanje nukleoproteidnog fosfora. Sve ekstrakcije i frakcionisanja za jednog pacova traju prema metodi J. Sachsa ukupno oko 10 dana.

Kada se završe ekstrakcije i izolacije pojedinačnih fosfornih organskih komponenata, pristupa se tehnici odvajanja čistog fosfata iz strukture organskih spojeva. Kada je i to završeno, talože se u neorganskoj formi fosfati, posebno za svaku frakciju pojedine životinje, te se zatim prečišćavaju i pripremaju za dve tehnike merenja.

Specijalnom tehnikom merenja utvrđuje se intenzitet radioaktivnosti radiofosfora u fosforu frakcije. Drugom tehnikom se u fosfatu iste frakcije meri količina ukupnog neaktivnog fosfora.

Kada se oba merenja završe, pristupa se preračunavanju izmerenih veličina prema određenom kriterijumu, da se nađeni podaci mogu međusobno upoređivati. Od podataka ovih računa sastavljaju se tablice, odnosno izrađuju grafikoni. Ako za upoređivanje nisu dovoljni sirovi i apsolutni podaci iz tablica, onda se dalje preračunavaju prema odgovarajućim osnovama (obično se apsolutni podaci prema raznim kriterijumima preračunavaju u procenat) te se ponovo unose u nove tablice itd.

Određeni podaci kasnije su iskorišćeni za izračunavanje reakcionih konstanti, ne bi li se možda putem primene zakona o delovanju aktivnih masa na svaku pojedinačnu reakciju (kao i na čitavi poredak) dobila osnova za rekonstrukciju reakcionog poretka.

Sada ćemo izneti još i specijalne tehničke podatke o praktičnom izvođenju eksperimenata u fazama, redom kojim su napred izložene.

Životinje su odabirane po određenim kriterijumima. Najpre smo želeli izbeći odstupanja koja bi mogla biti uzrokovana seksualnim razlikama u metabolizmu fosfora. Pošto su ženke potrebne za rasplodavanje, lakše nam je bilo skupiti dovoljan broj mužjaka. Prema starosti nismo mogli odabirati životinje, jer te podatke za prve tri serije nismo imali. S obzirom da, prema navodima iz literature, metabolizam fosfora gubi u intenzitetu sa starenjem, poželjno je da se eksperimenti vrše na životinjama iste starosti. Prema nalazima J. Sachsa (16), i rasa životinja ima značaj za promet fosfora. Stoga smo uvek upotrebljavali samo bele laboratorijske pacove istog porekla. S obzirom da nismo imali podatke za starost, mislili smo da ćemo donekle imati životinje slične starosti, ako budu približno jednake težine. Pošto je bilo teško u isti mah dobiti veliki broj pacova sasvim jednake težine, morali smo ih uzimati i sa raznim težinama. Ipak smo uspjeli da ih tako rasporedimo da oscilacije težina u jednoj eksperimentalnoj seriji ne pređu 50 g. Maksimalne težinske razlike među pacovima raznih serija kretale su se za oko 100%, jer su iznosile od 160 do 320 g., s tim da su unutar jedne serije razlike bile mnogo manje.

Svaka životinja je dobila oko 10 mikrokirija radiofosfora P^{32} , izuzev životinja I eksperimentalne serije, koje su primile nešto manju dozu, jer nam tehnika doziranja još nije bila besprekorna. Poznato je da P^{32} ima poluperiode zračenja u trajanju od 14,3 dana i energiju zračenja elektrona od 1,69 Mev-a. Radiofosfor davan je kao fosfat, rastvoren u puferu od običnog fosfata, sa $pH=7$. Doza od 10 mikrokirija, koja je davana svakom pacovu, bila je sadržana u 1 ccm puferskog rastvora. Neposredno pred davanje radiofosfora odvajan je hiljaditi deo od količine koja je davana pacovu, u svrhu proveravanja trenutne aktuelne veličine radioaktivnosti unesenog P^{32} (fosforni etalon). Svaki put kada je spreman novi rastvor P^{32} za davanje pacovima, pripremljena su po tri nova etalona za kontrolu radioaktivnosti P^{32} . Primenjen je oralni put za unošenje radioaktivnog fosfora u organizme pacova pomoću duodenalne sonde. Aktivni fosfor unesen je u prazni želudac gladnih pacova oko 12 sati posle obroka. Za četiri serije radiofosfor P^{32} nabavljen je iz Harvela (Engleska) posredstvom Instituta »Boris Kidrič« u Vinči, dok je za jednu seriju korišćen radiofosfor iz proizvodnje Instituta u Vinči.

Pošto su primile radiofosfor, životinje su smeštene (svaka posebno) u zatvorenim prostorijama, čije je dno bilo načinjeno od velikog levka (promera oko 30 cm). Na nivou od oko 10 cm ispod gornje ivice šupljina levka bila je prekrivena sitno satkanom bronzanom mrežom, koja je propuštala mokraću, ali ne i komadiće faecesa. Na ravnoj mreži boravio je pacov; tu je ležala i posudica sa hranom, dok je vodu primao kroz tavanicu tog prostora putem staklene cevčice, koja je izvirala iz oborene staklene posude (bočice). Ovakav uređaj obezbedio je s jedne strane da se spreči rasturanje radioaktivnog fosfora po prostoriji (te zagađivanje radioaktivnim materijalom predmeta i osoblja), dok je s druge strane omogućavao sakupljanje ukupne količine urina i faecesa za svaka 24 sata za potrebe merenja radioaktivnosti u eksperimentima. Pre merenja radioaktivnosti eksperimenata svakodnevno su najpre izmerene njihove

količine: ukupna količina urina ustanovljena je volumetrijski, dok je čitavi faeces izmeren gravimetrijski. Zatim je od dnevnog iznosa urina uzeta količina od svega 1 ccm, a od faecesa (pošto su komadići prethodno izmešani) takode samo oko 1 g. Posle sušenja, u oba uzroka izmerene su količine radioaktivnosti, po uobičajenim postupcima. Vrednosti dobivene merenjem radioaktivnosti jednog uzorka pomnožene su zatim sa dnevnim količinama urina (sa brojem ccm), odnosno sa dnevnim brojem gr. faecesa. Na kraju su obe veličine radioaktiviteta sabrane u zajedničkoj dnevnoj količini ekskremenata jednog pacova za određeni datum. Zatim su veličine radioaktivnosti za svakog pacova računskim putem korigovane na vrednosti koje bi bile da je merenje izvršeno na dan prve poluperiode (računajući od trenutka kada je radiofosfor unešen u životinju).

U svakoj eksperimentalnoj seriji uvek su po četiri životinje činile analitičku celinu, tj. tretirane su na sasvim identičan način i istovremeno. Dok su eksperimentalne serije bile označene rimskim brojevima (I, II, itd. serija), dotle su po četiri životinje formirale grupe koje su označavane velikim latiničnim slovima (grupa A, grupa C, grupa E, itd.). Individualne životinje iste grupe označavane su (pored znaka grupe) još i svojim rednim brojem, kao na pr.: Pacov A/1, ili A/3, gde A označava grupu, a arapski broj, individuu. Sve analize su rađene individualno, tj. posebno za svakog pacova. Naknadnim sabiranjem podataka za jednu frakciju od sve četiri životinje, i deljenjem sa brojem životinja dobiveni su prosečni aritmetički rezultati za jednog pacova date grupe. Time su individualne razlike u grupi, koje nisu uvek neznatne, svedene na statističke srednje veličine.

Dok je materijal za merenje radioaktivnosti u ekskrementima tokom dužeg perioda moguće uzimati svakodnevno od iste individue, dotle je to teško kada se merenja vrše u krvi, a nemoguće u jetrinim frakcijama. Uzimanje tih materijala za pojedini interval bilo je moguće samo da se za svaki interval žrtvuju po četiri nove životinje. Krv i jetra su vadene iz narkotisanog živog organizma. Narkoza je upotrebljena da bi se isključili refleksni uticaji, koje neminovno nanosi trauma. Pod dejstvom jake traume moglo bi eventualno doći do izmene u jetrinom metabolizmu, što bi možda moglo izmeniti uslove za raspodelu fosfora među organskim komponentama jetre. Primenjivana je kratka i površna etarska narkoza. U slučajevima kod kojih su uzimane krv i jetra, najpre je intrakardijalnom punkcijom vadena krv, a odmah zatim ekstirpirana je i jetra.

Postupak sa izvađenom krvlju bio je kratak, dok su procedure na izvađenoj jetri trajale preko 10 dana. Iz krvi je oslobođena samo neorganska frakcija i pripremljena za merenje, dok je ostatak krvi bačen. Naprotiv, u jetri su iskorišćeni svi fosforni derivati. S obzirom da se u jetri nalaze izvesne organske frakcije sa izvanredno kratkim periodom trajanja, bilo je nužno sačuvati ih od autolize. To je postignuto trenutnim zamrzavanjem jetre, putem njenog što je moguće bržeg bacanja u tečni vazduh neposredno posle ekstirpacije. Time su svi procesi metabolizma trenutno zaustavljeni, te i najmanje frakcije očuvane.

Posle merenja jetre i odvajanja smrznutih komadića za određivanje celokupne količine fosfora u jetri, glavni deo jetre zagrejan je do temperature leda, stavljanjem u ledeni rastvor trihlorsirćetne kiseline. Ekstrakcija acidsolubilnih frakcija i njihovo pojedinačno izolovanje iz

ekstrakta vršeno je prema uputstvima J. Sachsa (16). 5% ekstrakta odvojeno je za kontrolna merenja zajedničke količine fosfora u grupi acid-solubilnih frakcija kao celini, dok su iz 95% kiselog ekstrakta sukcesivno izdvajane pojedinačne acidsolubilne frakcije. Prva se izdvaja glikogenska frakcija, a zatim u toku deset dana jedna za drugom bivaju izolovane sve acidsolubilne frakcije. Iz svake se frakcije posebno oslobodi njen fosfat, koji se zatim posebno istaloži kao amonijev-fosfo-molibdat. Ovaj talog služi kako za merenja radioaktivnosti, tako i za kolorimetrijsko utvrđivanje ukupne količine običnog (neaktivnog) fosfora u toj frakciji. Time je sve pripremljeno za pristupanje završnom merenju ovih dveju vrednosti u grupi acidsolubilnih frakcija. Sve procedure po J. Sachsu vršili smo pri 0°C, izuzev centrifugovanja. Centrifugovali smo uvek pri sobnoj temperaturi, jer nismo imali centrifugu na ledu.

Tkivna kaša koja je preostala posle brze i kratkotrajne ekstrakcije pomoću trihlorsirćetne kiseline (pri dugotrajnoj ekstrakciji rastvara se i deo nukleoproteida; zato se mora izvršiti brzo, najduže za 10 do 15 minuta) podvrgava se novoj proceduri za ekstrakciju lipidne frakcije. To se vrši pomoću organskih rastvarača (za masti) prema modifikovanoj metodi po Hevesyju (etar, metil + etil-alkohol i hloroform). Ekstrahovanje se ponovi tri puta. Zatim se iz ekstrakta ispari ekstrakciono sredstvo, te se suvi ostatak žari u električnoj peći na temperaturi između 900° i 1.000°C. Da se ne bi isparila fosforna kiselina, doda se najpre višak NaOH, te omogućiti vezivanje oslobođenje fosforne kiseline u obliku Na-fosfata. Zatim se u keramičkoj posudi dobiveni pepeo rastvori (posle hlađenja) pomoću HNO₃. Najzad se oslobođeni fosfat istaloži u obliku amonijum-fosfo-molibdata. Time je i fosfor iz fosfolipoida spremljen za merenja radio-aktiviteta i količine običnog neaktivnog fosfora.

Kada se završi i drugo ekstrahovanje (pomoću organskih rastvarača), opet zaostaje tkivna kaša, u kojoj se nalaze još samo nukleoproteidi sa svojim fosforom. Ova se kaša najpre osuši, a potom žari u električnoj peći na sličnoj temperaturi kao kod žarenja fosfolipoidnog ekstrakta (takođe uz dodatak viška rastvora NaOH). Nastali pepeo rastvori se posle hlađenja kao i onaj iz fosfolipoida, te se najzad oslobodi fosfor iz strukture nukleoproteida. Pošto se fosfat istaloži sa amonijum molibdatom, dobije se talog koji služi kako za merenje radioaktivnosti, tako i neaktivnog P³¹ u fosforu iz nukleoproteida.

Kada su dobiveni talozi čistog fosfata iz raznih frakcija (svaki fosfat je signiran prema svom organskom poreklu — izuzev neorganskog, koji je od početka u slobodnom stanju, te nosi svoju signaturu), oni se dalje preparišu za odgovarajuću tehniku merenja: pripreme za merenje radioaktivnosti su drugačije od onih za merenje količine analitičkog (običnog-neradioaktivnog) fosfora.

Pripreme za merenje radioaktivnosti su sledeće. Istaloženi fosfat u kome se meri radioaktivnost odvaja se od tečnosti u kojoj je vršeno taloženje upotrebom posebno građenog filtra za ovu svrhu. Filtar prema originalnom modelu iz Hemijske laboratorije u Vinči u stvari predstavlja improvizacijom modifikovani sistem Nutsche-filtra. Razlika je u tome što je posuda za tečnost koja treba da se filtrira odvojena od poroznog dna, tako da se može naknadno staviti i prirevmeno pričvrstiti za dno koje se najpre pokrije filter-papir (marke Schleicher & Schüll № 589). Pod vakuumom tečnost prolazi kroz pore filtra i staklene ploče Nutsche-filtra,

a na filter-papiru se zadrži radioaktivni talog amonijum-fosfo-molibdata odgovarajuće frakcije. Po završetku filtracije filterpapir sa talogom najpre se pod vakuumom osuši, a zatim fiksira (takode pod vakuumom) prelivanjem retkog rastvora kolodijuma preko taloga. Kolodijum zalepi talog za filterpapir, čime se onemogućuju gubici taloga. Nakon što je fiksiran na koturiću od filterpapira, talog se zatim unese u posebnu posudicu (od aluminijuma) za merenje radioaktivnosti prema modelu iz Hemijskog odeljenja u Vinči. Pošto se posudica pokrije sasvim tankim (0,05 mm) slojem celofana, a poklopac pritegne finim zavrtanjem, posudica je spremna za podnošenje pod Geiger-Müllerovu cev za brojanje beta-zrakova. Ona se može meriti odmah, ali se isto tako može čuvati do dana prve poluperiode, te tada izmeriti, Ovim se postupkom izbegavaju računске operacije (pošto svi podaci koji nisu izmereni na završetku prve poluperiode moraju računski biti dovedeni na vrednost za taj dan).

Sva merenja radioaktivnosti izvršena su na skaleru sa Geiger-Müllerovom komorom za beta-zrake (iz proizvodnje Instituta za nuklearne nauke »Boris Kidrič« u Vinči). Brojačka ispravnost skalera proveravana je svaki put merenjem frekvencije gradske struje (Cc. 50 herca u sek.), dok je ispravnost Geiger-Müllerove komore proveravana pomoću standardnog etalona iz urana (proizvedenog u Hemijskoj laboratoriji u Vinči) sa jačinom beta- zračenja od oko 5.800 do 6.200 u minutu. Druga proveravanja Geiger-Müllerove komore (izuzev područja »platoa«) nisu vršena.

Delom usled kratkog veka radioaktivnosti P^{32} , aktivitet unetog radiofosfora naglo opada u organizmu. Opadanje radioaktivnosti usled fizičke dezintegracije putem emisije beta-zrakova ne sme se brkati sa smanjenjem radioaktivnosti u životinji koje nastaje kao posledica ekskrecije radiofosfora. Isto se tako ne sme poistovetiti opadanje radioaktivnosti u telesnim tečnostima (i u većini organa) zbog fizičke dezintegracije P^{32} atoma, sa opadanjem aktiviteta u njima kao posledica nagomilavanja radiofosfora u skeletnom sistemu. Fizički gubici usled radioaktivne dezintegracije u samom organizmu mogu se računskim putem ustanoviti iz formule o dezintegraciji. Taj se podatak onda može iskoristiti za korekturu izmerene vrednosti radioaktiviteta. Praktički, mi smo ovu nezgodu izbegli time što smo sve izmerene radioaktivnosti preračunali na vrednosti koje bi bile utvrđene da je postojala mogućnost da se sve radioaktivnosti izmere u istom vremenskom razmaku posle unošenja u organizam. Kao vreme u kome se radioaktivnosti većine frakcija i raznih vremenskih intervala iste serije mogu faktično izmeriti istovremeno, uzeto je vreme prve poluperiode radioaktiviteta, računajući od trenutka unošenja radiofosfora. Kao nulto vreme uzet je trenutak davanja radiofosfora pacovima, a kao polazna veličina radioaktivnosti uzeta je vrednost koja je u trenutku davanja izmerena u unetoj količini (tačnije: u etalonu koji je sadržavao 1/1.000 deo od unete količine, tj. od 10/mgC) radiofosfora. Prema tome, u našim tablicama svi iskazani radioaktiviteti označuju vrednost koja je postojala kod merenja na dan prve poluperiode, računajući poluperiodu od trenutka unošenja radiofosfora.

U svakoj frakciji iz jetre, uporedo sa merenjem radioaktivnosti u njenom fosfatu, merena je i količina običnog fosfora (koji inače služi kao nosilac radiofosfora fosforne frakcije). Za merenje količine neaktivnog — prirodnog — fosfora u frakciji, upotrebljena je obična kolorimetrijska tehnika. Za kolorimetriju fosfat mora biti pripremljen na odgo-

varajući način. U prvim dvema serijama isti talog korišćen je prvo za merenje radioaktivnosti, a posle toga podvrgnut je kolorimetrijskoj kvantitativnoj analizi. Pokazalo se kao nepraktično da se isti uzorak koristi i za merenje radioaktivnosti i za kolorimetriju. Stoga je u svim kasnijim eksperimentalnim serijama (III, IV i V) ukupna količina fosfora svake frakcije podeljena na dve jednake polovine još pre taloženja pomoću rastvora amonijevog molibdata. Postupak sa polovinom taloga koji služi za merenje radioaktivnosti već je opisan. Druga polovina taloga (u kojoj su takođe pomešani radioaktivni i obični fosfor frakcije) filtrira se i prečišćava preko staklenog (poroznog) Gutsch-filtra N^o G-4. Na staklenom filtru zadržava se samo talog amonijum-fosfo-molibdata, koji se zatim još i ispere najmanje tri puta (da bi se uklonio višak molibdata). Kada je ispiranje taloga završeno, na stakleni filter sa talogom naliže se rastvor NaOH n/10, u kome se talog potpuno rastvori. Pod vakumom se zatim profiltrira rastvor u podmetnutu odmernu tikvicu (Messkolben) određenog valumena.*) Stakleni se filter zatim ispere destilovanom vodom, koja se takođe filtracijom prenese u odmernu tikvicu. Ova se najzad dopuni čistom vodom do marke. Time je pripremljen rastvor fosfata jedne frakcije, te može poslužiti za kolorimetrijske analize.

Kolorimetrijsku analizu izveli smo prema proceduri za određivanje običnog analitičkog fosfora po Benedictu (1). U prvim dvema eksperimentalnim serijama kolorimetrijska merenja vršena su pomoću Pulfrichovog fotometra**), dok su u kasnijim serijama sva kolorimetrijska merenja vršena na Beckmanovom spektrofotometru, model DU, u Fiziološkom institutu Medicinskog fakulteta u Sarajevu. Na Pulfrichovom fotometru sve analize su izvršene preko filtra S-69, za koji su prethodno izrađene odgovarajuće krivulje. Na spektrofotometru (Beckman) merenja su vršena pomoću svetlosti talasne dužine 750 milimikrona.

Svi radioaktivni otpaci (svi ekskrementi, leševi žrtvovanih pacova, kao i ostaci od izmerenih frakcija) prikupljani su pažljivo, te stavljeni u staklene posude. Posude su zatim dobro zatvorene i zapakovane u bašti Medicinskog fakulteta, u jame duboke oko 2 metra. Pošto radiofosfor ima relativno kratku poluperiodu života, to zračenje pokopanih otpadaka brzo iščezava. Sa radioaktivnim materijalom i svim otpacima rukovale su samo za to izvežbane osobe, koje su poznavale sve opasnosti od zračenja, te su bile osposobljene za bezopasno rukovanje tim materijalima.

Iz jetre su izolovane sledeće pojedinačne i opšte frakcije fosfora, u kojima je merena i veličina radioaktivnosti i količina prirodnog neaktivnog fosfora P³¹:

1) Neorganski fosfor jetre. Ovo jedinjenje fosfora čini najveću frakciju u grupi acidsolubilnih spojeva u jetri pacova. Naše cifre (za veličine radioaktivnosti, kao i za količine neaktivnog fosfora) označavaju samo

*) Volumen posude odredi se prema koncentraciji fosfora u pojedinoj frakciji. Tako napr. za frakcije sa mnogo fosfora, kao što su celokupni fosfor jetre, odnosno ukupni acidsolubilni fosfor, zatim neorganski fosfor ili fosfor iz fosfolipoida, kao i iz nekleoproteida, uvek je uzimana odmernu tikvicu od 100 ccm, dok je za manje frakcije uzimana posudica za merenje od 50 ili čak od 25 ccm kao napr. za kofermente, ili za fosfor iz glikogena, Cori-estra, itd.

**) Fotometar smo dobili od Fiziološkog instituta Veterinarskog fakulteta u Beogradu, blagodareći dobroti akademika prof. dr. I. Đuričića.

ukupne količine ove frakcije u jetri, ne odvajajući količine intracelularnog neorganskog fosfora od ekstracelularnog (iz limfe). Intracelularni neorganski fosfor jetre u stvari jedino služi kao neposredna sirovina za organske sinteze u ćelijama, ali ga nismo posebno određivali.

2) P — iz šećernih estara sa fosfornom kiselinom. Svaka frakcija ove grupe (glikogenski-P, Cori-estar, Robizon-estar, Neuberg-estar; triozofosfati, itd.) izolovana je posebno, odgovarajućom tehnikom, a zatim kvantitativno određivana. Za našu temu trenutno nemaju značaja posebne frakcije unutar grupe šećera kao takve (pošto u njima izmene bivaju ne seobom fosfora, već putem preobražavanja organskih radikala). Zato su pojedinačne cifre za količine fosfora iz posebnih frakcija šećerne grupe naknadno sabrane u zajedničku cifru, koja je za svaku životinju iskazana kao zbirna vrednost te označava ukupni fosfor čitave grupe šećernih frakcija.

3) P — iz adenozin trifosfata (ATP) iskazan je u dve odvojene frakcije fosfora; obično veću frakciju sačinjava labilno vezani — pirofosfatni fosfor (labilna frakcija iz ATP i iz ADP), dok manju frakciju sačinjava estarski vezani molekul fosforne kiseline (za ribozu, nalazeći se u strukturi osnovnog molekula adenilne kiseline iz ATP-a), a označen je kao stabilni P iz ATP.

4) P — iz slobodne adenilne kiseline iskazan je u svim serijama kao posebna cifra.

5) Frakcija kofermentskog — P iskazana je kao samostalna vrednost u svim eksperimentalnim serijama.

Sve gore pomenute frakcije pripadaju grupi acidsolubilnih (1—5). Pored njih izolovane su iz jetre još i sledeće, koje nisu acidsolubilne:

6) P — iz fosfolipoida (fosfatida) izolovan je iz ekstrakta dobivenog iz jetrinog tkiva pomoću rastvarača za masti. Posle kisele ekstrakcije acidsolubilnih komponenata (Sachsovom metodom), kašasti ostatak jetrinog tkiva triput je podvrgnuta ekstrahovanju pomoću eter-alkohol-hloroforma (prema modifikovanoj metodi Hevesya) te je dobiven lipoidski ekstrakt. Mehaničko odvajanje tečnog dela ekstrakta od tkivne kaše izvršeno je pomoću centrifuge. Ispravljanjem sredstava za ekstrakciju dobiven je materijal iz koga je oslobođen lipoidski fosfor.

7) P — iz nukleoproteida izolovan je najzad iz tkivne kaše iz koje je prethodno izvučeno sve što je bilo rastvorljivo ili u kiselini, ili u rastvaračima za masti. Oksidacijom po Kjeldhalu (u prve dve serije), ili žarenjem u električnoj peći (u III i IV seriji) posle prethodnog sušenja, iz krajnjeg ostatka tkivne kaše oslobođen je najzad nukleoproteidski fosfor.

U svrhu kontrolnih analiza, od svake jetre uzete su još dve probe za merenja:

8) Zbirni acidsolubilni — P utvrđivan je u kiselom ekstraktu načinjenom po Sachs. Počev od treće serije, za svaku jetru je odvajan 1/20 deo kiselog ekstrakta, u kome je merena ukupna radioaktivnost fosfora cele acidsolubilne grupe frakcija, odnosno određivana količina fosfora u celoj grupi frakcija. Ostatak od 95% acidsolubilnog ekstrakta upotrebljen je za izolacije posebnih acidsolubilnih frakcija (po Sachsovoj proceduri, vidi frakcije 1—5).

9) **Celokupni P jetre**, određivan je počev od treće eksperimentalne serije. U tu svrhu uziman je komadić smrznute jetre, koji je posle merenja na analitičkoj vagi podvrgnut sušenju i žarenju. Iz rastvorenog pepela dobiven je fosfor čistavog komadića jetre. Iz izmerene količine izračunata je zatim vrednost za 100 g sveže jetre.

Rezultate merenja prikazaćemo u četiri posebna poglavlja, tako da će u svakom poglavlju biti obuhvaćena jedna od ispitanih problematika.

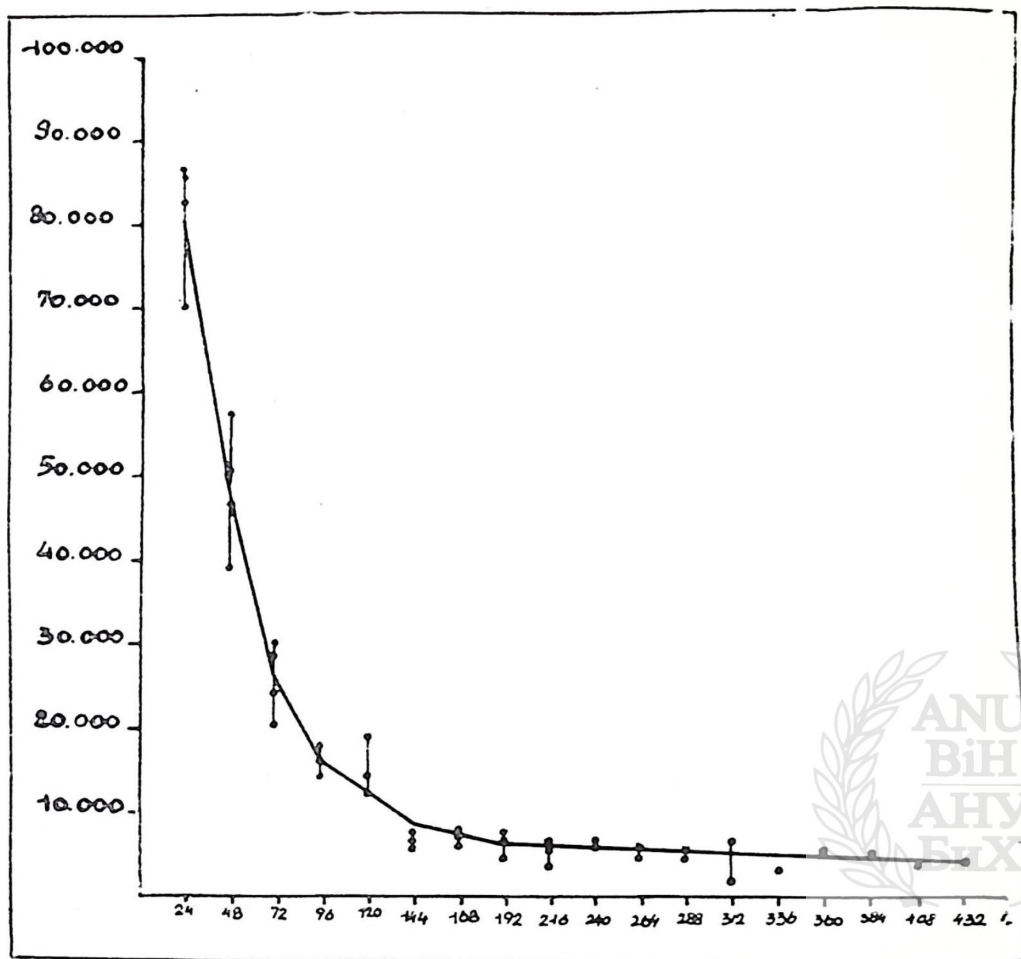
B. — ANALIZE RADIOAKTIVNOG FOSFORA

1. — Proučavanje bilansa prometa radiofosfora u organizmu pacova

Radiofosfor- P^{32} ponaša se u hemijskim reakcijama istovetno kao i prirodni fosfor- P^{31} . Kada se unese u organizam u obliku neorganskog Na-fosfata, radiofosfor se vrlo brzo izmeša sa prirodnim neorganskim fosforom telesnih tečnosti (krv + limfa) (10). Ubrzo zatim radiofosfor prelazi i u ćelije svih organa (10), te u ćelijama njegova količina raste, dok se ne izjednači sa koncentracijom u telesnim tečnostima, što se ispoljava u jednakim veličinama specifične aktivnosti.

Za sticanje uvida o učešću radiofosfora u metabolizmu u jetri trebalo je najpre utvrditi koliko od unete količine ostaje na raspoloženju organizmu, a koliko se gubi putem ekskrecije, tj. ustanoviti bilans prometa radiofosfora. Za utvrđivanje bilansa potrebno je ustanoviti dve veličine: ulaznu i izlaznu količinu radiofosfora. Ulazna količina određena je prilikom unošenja radiofosfora. Već je pomenuto da smo u našim eksperimentima svakom pacocu davali radiofosfora u iznosu oko 10 mikrokirija. Pošto smo pre davanja odmerili 1/1.000 deo od unete doze njeno upoređivanje sa ekskrecijom mogli smo izvršiti u principu na dva načina. Mogli smo s jedne strane određivati totalne količine radiofosfora u ekskretu, te ustanoviti koliki je to deo od 10 mikrokirija (pošto je to totalna količina koja je unesena putem želuca). Drugi put sastojao se u tome da se na Geigerovom brojaču izmere samo relativne količine, tj. onaj deo totalne količine, koju upotrebljeni Geigerov brojač stvarno konstatuje. U tu svrhu bilo je dovoljno izmeriti radioaktivnost unete količine radiofosfora na Geigerovom brojaču, te odmerenu veličinu unete doze kao etalon upoređivati sa veličinom ekskrecije, izmerenom na istom Geigerovom aparatu. Pošto Geigerova komora pod istim geometrijskim uslovima merenja registruje isti procenat od totalne količine emitovanih beta-zrakova radiofosfora, dovoljno je izbrojati faktičnu aktivnost na aparatu, kako unete doze tako i ekskreta, tj. ukoliko su i drugi uslovi istovetni — kao napr. apsorpcija i autoapsorpcija. Srazmere između te dve veličine biće iste kao i da su im utvrđivane i totalne količine radioaktivnosti. U našim ekskrementima upoređivali smo pod identičnim uslovima samo ove relativne veličine unešenog aktiviteta sa relativnim veličinama izlučivanja.

U grafikonu br. 1 prikazane su veličine ukupne radioaktivnosti, koje su izmerene u ekskrementima (u urinu i u faecesu) sabranim u razmacima od po 24 h. Grafikon obuhvata veličine ekskrecije radiofosfora za 16 pacova iz prve eksperimentalne serije. Pri tom su u prvim danima praćenja (3 dana) ekskrementi hvatani i mereni od 16 pacova. Posle 3 dana broj pacova u analizi smanjio se za četiri, jer su četiri pacova



Grafikon br. 1.

Krivulja ekskrecije radioforfora- P^{32} . — Ekskrementi (urin + faeces) hvatani su svaka 24h, te su u njima redovno mereni masa i radioaktivnost. Na ordinati su ispisane količine radioaktivnosti (broj impulsa u minutu) u dnevnoj količini ekskremenata. Na apscisi su označena vremena (svaka 24h) hvatanja ekskremenata. U prva tri dana ekskrementi su uzeti od 16 pacova, zatim do 9-tog dana od 12 pacova, posle toga do 16-tog dana od 8 pacova. U prva 24h izlučeno je blizu 10% od unete doze, sledećeg dana oko 5,5%, itd.

žrtvovana (za ekstirpaciju jetre). Do 10-og dana ispitana je veličina ekskrecije radiofosfora samo kod 12 pacova. Posle toga, do 16-og dana, ekskrecija radiofosfora praćena je samo još kod 8 pacova, da bi počev od tog dana ispitivanja bila vršena svega na 4 pacova do 36. dana, kada su žrtvovani i poslednji pacovi iz prve eksperimentalne serije (radi uzimanja jetre). Naša tablica obuhvata samo ekskrecije za prvih 18 dana. Veličina ekskrecije posle 18 dana prilično su ustaljene, te opadanje ekskrecije napreduje vrlo lagano.

Bilans prometa fosfora pratili smo samo merenjem količina unošenja i izlučivanja radiofosfora, ali ne i prirodnog fosfora P^{31} . Zato smo u ekskrementima merili samo veličine radioaktivnosti.

Iz grafikona br. 1 može se videti da je ukupna količina izlučivanja radiofosfora najveća tokom prva 24h. Posle toga radioaktivnost ekskrementa progresivno (i u početku naglo) opada, što teče prilično paralelno sa opadanjem radioaktivnosti u krvi (vidi grafikon br. 2). U tablici br. 1 izložene su prosečne vrednosti ekskrecije za jednog pacova, izračunate iz ukupne ekskrecije za 24h od svih pacova ove serije ispitanih određenog dana. Za prva tri dana prosek je izračunavan iz ekskremenata od 16 pacova. U periodu od 4 do 10 dana prosek se odnosi na ekskreme od 12 pacova. U daljem periodu od 16 dana prosek je dobiven iz ekskreta od svega 8 pacova. Posle toga prosek potiče od svega 4 pacova (tj. prosek jedne jedine grupe, ovde konkretno grupe E).

Prosečno izlučivanje radiofosfora u ekskretima jednog pacova za prvih 24h iznosi 80,042 beta-zračenja u svakom minutu. Za utvrđivanje bilansa za prvih 24h potrebno je ovu količinu, dobivenu sa Geigerovog brojača na kome smo merili, uporediti sa aktivnošću unesenog radiofosfora, izmerenom na istom Geigerovom aparatu, pod jednakim geometrijskim uslovima (tj. u istoj posudi za merenje i na jednakom odstojanju od Geigerove komore). Kako je prema našoj Geigerovoj komori veličina radiaktivnosti čitave količine od 10 mikrokirija na dan prve poluperiode iznosila 830.000*) u minutu izlazi da je za prva 24h izlučeno 9,77% od unete količine. Potsećamo da su oba merenja, tj. etalon i ekskret, izvršena u istom vremenu, tj. na dan I poluperiode, jer smo etalon koji je ranije bio pripremljen od unesenog radiofosfora merili ne samo u trenutku aplikacije, već smo ga čuvali do dana prve poluperiode, te njegovu aktivnost ponovo izmerili u trenutku utvrđivanja aktivnosti ekskremenata (tj. samo onih koji su bili izlučeni do dana poluperiode, dok su ostali mereni kasnije, a računski su korigovani na veličine za dan prve poluperiode). Između 24 i 48 časova prosečna ekskrecija radiofosfora za jednog od 16 pacova iznosila je 48.223 tj. oko 5,7% od unete količine. Trećeg eksperimentalnog dana prosečna ekskrecija za jednog pacova smanjena je na 3,12%. Zatim je četvrtog dana pala na 1,94%, petog dana ekskrecija iznosi svega 1,71%; 6-og dana pada dalje na 0,84% od unete količine itd. Ponavljamo da su u podacima ekskrecija unete korekture za promene u veličini radioaktivnosti koje nastaju zbog fizičke dezintegracije, te su sve vrednosti računski svedene na zajednički dan, tj. na dan prve poluperiode.

Evidentno je da je ekskrecija najveća za prva 24h, te zahvata blizu 10% od unete količine, dok drugog dana ekskrecija naglo opada skoro na polovinu od te vrednosti. Da bi se izlučilo još 10%, potrebno je da prođu još tri dana (posle 4 dana ukupna ekskrecija iznosi 20,53%). Da ekskrecija dostigne trećinu unete količine radiofosfora, potrebno je da prođe još 16 dana, tj. trećina je izlučena tek posle približno 20 dana. Za izlučivanje polovine unete količine verovatno je potrebno da prođe preko 50 dana (posle 36 dana izlučeno je tek oko 40% od unete količine). Merenje radioaktivnosti u samim ekskrementima ne ukazuje na uzroke koji dovode do naglog opadanja količine radiofosfora u ekskreciji. Razlog ćemo naći u sledećoj grupi eksperimenata.

*) Efikasnost ove komore iznosila je kod položaja preparata na gornjoj polici nešto preko 5% za radiofosfor P^{32} . Prema tome u svim preparatima je izmereno oko 5% od totalnog aktiviteta. U našim tabelama izneti su ovi izmereni aktiviteti bez izračunavanja totalnog aktiviteta frakcija.

Uporedivši naše rezultate o ekskreciji radiofosfora sa nalazima drugih autora, našli smo sledeće činjenice. Hevesy citira (10) svoje i tuđe podatke, od kojih se neki dobro slažu sa našima, dok se drugi sasvim razlikuju kako od naših tako i od njegovih podataka. Tako napr. ovaj autor u tablici br. 18 svoje monografije (10) iznosi da je izlučivanje za prva 24 sata obuhvatilo oko 8,5% kod normalnih pacova, dok je za isti vremenski period kod životinja zračenih rentgenovim zracima izlučivanje radiofosfora nešto veće (tj. oko 10% od unete količine). Ove se dve Hevesyjeve cifre dobro slažu sa našim nalazima, jer naši podaci za normalne pacove stoje između ovih dveju vrednosti. Na istoj strani pomenutog citata, ovaj autor iznosi i tuđe eksperimente (10), gde je tokom prvih 90 časova kod normalnih pacova oko 24% radiofosfora izlučeno putem bubrega i 2,6% preko faecesa, što se još uvek relativno dobro slaže sa našim nalazima, jer naši pacovi posle 92 sata izlučuju 20,53% od unesene količine radiofosfora. Međutim na trećem mestu istog teksta Hevesy daje takode tuđe podatke (10) koji se potpuno razlikuju kako od naših tako i od njega pomenutih, jer se posle 64 do 80h izlučuje svega oko 0,16% od unete količine radiofosfora. Ovi se poslednji navodi doduše odnose na kokoši.

Iz gornjih rezultata se vidi da je zadržavanje radiofosfora u organizmu pacova relativno dugotrajno, te je analize sa njim moguće vršiti u prilično dugom periodu premena. Ipak postoje teškoće iz druga dva razloga, zbog kojih se u vrlo kratkom periodu radiofosfor ipak znatno smanjuje u tkivu jetre. Jedan razlog sadržan je u činjenici da se radiofosfor u organizmu neprekidno transmutira u neaktivni sumpor S^{32} putem beta-zračenja. Drugi faktor koji smanjuje količinu radiofosfora u cirkulaciji i u jetri vezan je za brzu koncentraciju najveće količine radiofosfora u tkivima skeletnog sistema.

2. Raspodela radiofosfora u nekim funkcionalnim područjima organizma pacova

U ovom radu nismo utvrđivali raspodele radiofosfora u svim organima pacova, jer je to prevazilazilo snage koje su bile angažovane u njemu, a to najzad nije bio naš eksperimentalni zadatak. Za naše potrebe bilo je dovoljno ustanoviti raspodelu u svega nekoliko funkcionalnih područja u organizmima pacova, tj. u jetri, u proizvodima ekskretornih organa i u krvi (koja snabdeva radiofosforom te organe). Raspodela obuhvata, dakle, samo krvni, jetrin fosfor kao i radiofosfor u ekskreciji. Distribucija među ove organe, kao i veličina ekskrecije, daju nam potrebne informacije o opštoj situaciji kojom je bio uslovljen promet radiofosfora u periodu njegovog ulaženja u metabolizam organskih jedinjenja u jetri.

Pomešanost veštačkog radiofosfora sa prirodnim fosforom morala bi se, vrlo brzo (posle unošenja), ostvariti u neorganskom fosforu celog organizma: ne samo u telesnim tečnostima, već i u ćelijama svih organa, odnosno u proizvodima delatnosti tih organa (sekretima, ekskrementima i u unutrašnjim sastojcima samih ćelija). Pri tom organi mogu primati radiofosfor iz telesnih tečnosti samo u proporciji u kojoj je on prisutan u ovima. Kolikom će brzinom ćelije primati radiofosfor mora zavisi

prvenstveno od osnovne brzine kojom neki organ uopšte obnavlja neorganski fosfor u svome sastavu, kao i od afiniteta kojim ga tkivo organa vezuje za sebe.

Cohn i Greenberg (7) našli su da na jedinicu težine najviše radiofosfora vežu kosti, mada u samom početku eksperimenta (tj. u prvim satima posle unošenja u organizam) srazmerno velike količine radiofosfora bivaju vezane i za tkiva drugih organa. U prvim satima posle unošenja radiofosfora, radioaktivnost je prema nalazu ovih autora raspodeljena po sledećem gradijentu opadanja: kosti (najviše), jetra, želudac i tanko crevo, srce, bubrezi, pluća, krv, mišići, koža, itd. Najmanja količina radioaktivnosti nađena je u mozgu. Prema Gauntu i saradnicima (9) u kasnijim periodima eksperimenta procenat vezivanja radiofosfora za kosti neprekidno raste, dok se istovremeno procenat njegovog vezivanja u tkivima ostalih organa progresivno smanjuje (na pr. posle 100h u kostima već je akumulisano preko 90% prisutne količine radiofosfora). Prema Tweedyu i Campbellu (23) stepen ukupnog vezivanja radiofosfora za organe pacova opada uporedo sa starenjem organizma.

Nalazi pomenutih autora pokazali su da koštani sistem veoma brzo fiksira ogromnu količinu radiofosfora. Ako dodamo da se, u periodu u kome kosti vežu preko 90% prisutnog radiofosfora (posle 100h), još i putem ekskrecije izbaci preko 20% unete količine radiofosfora (vidi prethodno poglavlje), onda jasno izlazi da svi organi vrlo brzo posle unošenja ovog izotopa (izuzev kostiju u kojima se apsolutna količina radiofosfora neprekidno povećava tokom prvih 100h), moraju početi da ga gube iz svog sastava. Opšta brzina opadanja količine radiofosfora u organima zavisi još i od puta i načina unošenja, kao i od brzine resorpcije, odnosno od prelaženja ovog izotopa u opštu cirkulaciju. Kod brzog unošenja intravenskim putem, opadanje radioaktivnosti počinje obično već posle nekoliko minuta (10); kod intraperitonealnog unošenja, i pored relativno brze resorpcije, visoka radioaktivnost održava se u cirkulaciji (i organima) duže nego posle intravenskog unošenja. Ipak se maksimum radioaktivnosti po pravilu retko održava duže od 2 sata posle unošenja. Najduže se održava visoka radioaktivnost u cirkulaciji i organima posle peroralnog unošenja. Smanjenje aktiviteta usled dezintegracije radiofosfora putem transmutacije u neradioaktivni sumpor S^{32} ispoljila se u organima prilikom merenja aktiviteta, ali ne i u rezultatima, jer smo kod svih cifara ove gubitke računanskim putem već iskorigovali, te se u našim tablicama ne pojavljuju.

S obzirom da smo radiofosfor u tela pacova unosili svega jednom, jasno je da usled neprekidnog opadanja radioaktivnosti u organima analize moraju biti izvođene u poznatim vremenskim intervalima. Veličine vremenskih intervala u kojima su uzimani uzorci organa za analize, bili su različiti u pojedinim eksperimentalnim serijama, zavisno od posebnog eksperimentalnog zadatka postavljenog u toj seriji. Pošto je prva eksperimentalna serija imala prvenstveno orijentacioni karakter, uzeti su duži vremenski intervali (6, 72, 120, 374, 864h) sa ukupno dugim trajanjem eksperimenta (vidi grafikon br 3/I). U ovoj seriji izmerene su uporedo još i veličine ekskrecije radiofosfora (u svrhu izračunavanja bilansa prometa). U drugoj eksperimentalnoj seriji vremenski intervali za uzimanje uzorka bili su mnogo kraći (vidi grafikon br. 3/II), te je i najranije (startno) vreme za uzimanje prvog uzorka uzeto kratko (2h posle

unošenja radiofosfora). U ovoj su seriji izvršena i sva merenja radioaktivnosti u krvi. U trećoj i četvrtoj eksperimentalnoj seriji (vidi grafikon 3/III i 3/IV) uzimani su uzorci i iz onih međuvremena koja su u ranijim serijama ostala neispitana, ali s tim da je uvek kao strartno vreme za najraniji uzorak zadržan period od 2 h. U dvema poslednjim eksperimentalnim serijama vršene su i takve analize koje nisu imale analitički, već kontrolni karakter: ispitana je celokupna količina fosfora (radioaktivnog i običnog) u deliću jetrinog tkiva, a isto tako utvrđivana je i zbirna količina (obe vrste) fosfora u acisolubilnim frakcijama uzetim skupa. Uzimanje uzoraka za pojedine vrste analize tako je isprepleteno po raznim eksperimentalnim serijama, da one čine eksperimentalnu celinu, mada obrađuju četiri različita posebna problema, koji su ((drugim sistemom organizacije rada) možda mogli biti ispitani i publikovani kao posebni radovi.

Za ustanovljenje stepena raspodele radiofosfora među pomenutim organima koristili smo samo vrednosti neorganske frakcije (kao stacionarne količine u tim organima), a ne čitave iznose radioaktivnosti tih organa. Prvenstveno je bilo značajno da utvrdimo kako se među ove organe raspoređuje osnovna sirovina (neorganska frakcija radiofosfora), jer ona pretstavlja početnu veličinu »reagujuće mase«, koja u smislu Guldberg-Waageovog zakona neposredno uslovljuje dinamiku izvršenja organskih sinteza.

Najpre ćemo proučiti kretanje količine radiofosfora u neorganskoj frakciji jetre tokom eksperimentalnog vremena.

Kretanje radioaktivnosti neorganskog fosfora u jetri pacova tokom raznih vremenskih intervala prikazano je u grafikonu 3/I-IV. Obuhvaćeni su podaci od 87 pacova iz četiri eksperimentalne serije. Analize radioaktivnosti jetara pacova (obuhvaćenih u sve četiri eksperimentalne serije) izvršene su u 12 raznih vremenskih intervala, s tim da pojedine serije maksimalno obuhvataju 6 grupa po 4 pacova, ubijenih u 6 raznih vremenskih intervala. Svaka eksperimentalna serija ima drugačiju kombinaciju vremenskih intervala, s tim da obično neka vremena budu istovetna sa intervalima drugih serija. Najviše identičnih vremena postoje u intervalima od 2,4 i 24h. Raspored vremenskih intervala kod pojedinih serija bio je uslovljen potrebama parcijalnog zadatka, koji je rešavan u datoj seriji. U kasnijim serijama ovaj parcijalni zadatak bio je diktiran i rezultatima prethodnih serija.

Ako bacimo pogled na grafikon 3/I-IV, pada nam pre svega u oči nejednakost vremenskih intervala u pojedinim serijama. Dok su u prvoj eksperimentalnoj seriji merenja u celom vršena nešto kasnije tek počev od 6 h posle unošenja radiofosfora) i u većim razmacima, dotle su u trećoj seriji tri merenja vršena u ranim satima posle davanja, a svega dva vremenska intervala uzeta su nešto kasnije (ali i ona se nalaze unutar prvih 48h). Druga serija pored dva rana vremena, naročito prati kretanje radioaktiviteta u srednje ranim vremenima (od 12 do 48 h, kao i jedno merenje posle 120h). Četvrta serija, pored dva rana i jednog srednjeg vremena, kontroliše kretanje radioaktivnosti u kasnom stadijumu eksperimenata (analogno analizama u prvoj seriji). Pošto su kod svih serija (izuzev prve) aktiviteti uvek mereni u ista prva dva vremenska intervala,

dobivena je zajednička osnova za upoređenja i drugih, inače nepodudarnih vremena. Ako se u pojedinim serijama uporede kretanja radioaktivnosti neorganske frakcije jetre za razne vremenske intervale, vidi se relativno dobro slaganje i pored znatnih odstupanja kod pojedinih eksperimentalnih serija. Dakle, isti intervali iz raznih serija dobro se slažu, a podaci iz međuintervalu skladno se uklapaju u zajednički redosled opadanja radioaktivnosti (vidi grafikon 4/1). Veća odstupanja prosečnih veličina radioaktiviteta neorganskog fosfora vide se samo u intervalima od 72 i od 120h. U intervalu od 72h izmereni prosek je manji, dok je u intervalu od 120h viši od stvarne, tj. srednje statičke vrednosti progresije opadanja radioaktiviteta.

U prva dva vremenska intervala (2 i 4h) veličine radioaktivnosti neorganske frakcije pokazuju najveće oscilacije ako se uporede vrednosti triju serija za isto vreme (vidi grafikon br. 4/1). Za tri serije (II, III i IV) razlike između apsolutnih veličina radioaktivnosti osciliraju za 40% oko srednje vrednosti u intervalu od 2 h, dok su u drugom, i u kasnijim intervalima, znatno manje. Upoređenja sa prvom serijom se ne mogu vršiti direktno za prva dva intervala, jer su u prvoj seriji merenja počela tek sa 6-tim satom. Maksimum apsolutne radioaktivnosti neorganskog fosfora u jetri pacova III i IV eksperimentalne serije ima najveće apsolutne veličine, a dostignut je već posle 2 h od unošenja radiofosfora, dok je u jetri pacova II serije maksimum znatno niži, a ostvaren je tek posle 4 sata (vidi grafikon 3/I-IV). U svim ispitanim serijama posle ovog ranog maksimuma radioaktivnosti dolazi do naglog smanjenja aktiviteta u neorganskoj frakciji jetre. Progresija opadanja radioaktiviteta nije sasvim identična za sve eksperimentalne serije. Odstupanja su najveća u II i I seriji. U drugoj seriji ne samo dostizanje maksimuma, već i kasnije opadanje ima sporiji tok nego što je slučaj u III i IV seriji. Za prvu seriju maksimalna radioaktivnost nalazi se tek u 6 satu (jer ranije nismo ni merili). Ipak moramo uzeti da je maksimum i ovde morao biti ranije. Ako kao osnovu za upoređenje upotrebimo III seriju, gde su merenja vršena u vremenskim intervalima od 2,4 i 6h, onda bismo mogli uzeti da je aktivitet prve serije za 6 h sličan onome iz te serije, tj. nešto preko 30% od verovatnog maksimuma (koji postavljamo u interval posle 2 h). Kod svih serija, kao i u proseku, opadanje radioaktivnosti posle maksimuma najveće je tokom prva 24h. Unutar prvog dana najveće opadanje se vidi u prvim satima posle maksimuma. Iz tih razloga maksimum u prvoj seriji ne možemo uzeti u 6 h, jer tada progresija opadanja u kasnijim vremenskim intervalima te serije (u poređenju sa ostalim serijama) dobije sasvim usporom tok, što verovatno nije realno.

Ako podelimo veličinu aktiviteta iz jednog vremena sa sledećim, vidimo da za svaki interval postoji određen koeficijent opadanja u odnosu na prethodno stanje (ovi se mogu uporediti ako se kod raznih serija račun izvede za jednake vremenske razmake). Koeficijent opadanja najveći je tokom prva 24h, kada je za oko 4 puta veći od koeficijenta za sledeća 24h. Izuzetak od opšteg tipa koeficijenta postoji u II seriji za intervale od 12 i 24h i proseku za intervale od 72 i 120, jer je apsolutna veličina aktiviteta za 24h veća od vrednosti za 12h, odnosno aktivitet u 120h veći je od onog u 72h, što je nenormalno (vidi grafikon 3/II — moguće tehnička greška?). Koeficijent opadanja postepeno biva sve manji, jer se aktiviteti za jedinicu vremenskog razmaka u kasnijim pe-

riodima sve manje razlikuju međusobno, što nije slučaj kod ranih razmaka. Opšti tok promena aktiviteta u jetri ide uporedo sa progresijom opadanja radioaktiviteta u ekskreciji.

Pored odvojenih podataka za pojedine eksperimentalne serije, izračunate su i opšte prosečne vrednosti aktiviteta svih serija za pojedino eksperimentalno vreme. Na prvi pogled je uočljivo da je zajednički maksimum postignut već posle 2h. Aktivitet i posle 4 sata već je opao na približno 70%, da bi posle 6h opao čak na vrednosti oko četvrtine vrednosti maksimuma. Posle 12 sati postoji još svega oko 1/5 prvobitne aktivnosti (iz maksimuma), a posle 24 sata svega oko 1/6 maksimalne aktivnosti (vidi grafikon br. 4/1). Sledeći podatak potiče iz intervala od 48h, a iznosi svega oko 1/9 od prvobitne aktivnosti neorganskog fosfora jetre pacova. Posle toga progresija opadanja teče sporije, tako da posle 120h još uvek radioaktivnost iznosi oko 1/12 od maksimalne veličine (dakle od 48 do 120 aktivitet je opao svega za 20%), što je za taj interval previsoka vrednost pogotovo s obzirom na interval od 72h, gde je nađen aktivitet od 1/22 prvobitnog maksimuma. Obrnuti raspored veličina za ova dva intervala bio bi mnogo realniji, ali činjenice su u analizi tako nađene.

Kretanje radiaktivnosti u neorganskom fosforu u krvi ispitano je u pet vremenskih razmaka na pacovima II eksperimentalne serije. Ove analize nametnule su se kao nužne iz rezultata prethodnih proučavanja ekskrecije radiofosfora i kretanja radioaktivnosti u neorganskoj frakciji fosfora u jetri (vidi tablicu 1 kao i grafikone 1, 2 i 3). Krv za analizu je uzimana u istim vremenskim intervalima u kojima su pacovi ove serije inače žrtvovani radi analize jetara. Vađenje krvi vršeno je neposredno pred samo žrtvovanje, čim je narkoza dostigla potrebnu dubinu. Krv je uzeta direktno iz srca (posle otvaranja toraksa). Kako je krv iz prvog vremenskog intervala (2h) propala, maksimum aktivnosti nađen je u periodu od 4h (vidi grafikon br. 2/3). Da li u vremenu pre 4h postoji paralelnost između radioaktivnosti neorganskog fosfora u krvi i u jetri pacova te iste serije, nemoguće je ustanoviti pošto za krv raniji podatak ne postoji.

Preračunato na 100 g mase, aktivitet neorganskog fosfora u krvi pacova iznosi 264.000 beta zrakova u minutu (vidi tablicu br. 1 i grafikon br. 2), ako se krv za analizu uzme posle 4h od momenta davanja radiofosfora. Za kasnije sate vrednosti se vide u tablici i grafikonu. Upadljivo je da se u krvi pacova iz druge eksperimentalne serije pojavljuje ista disproporcija opadanja aktiviteta, koju smo ranije ustanovili za 12 i 24h u neorganskoj frakciji fosfora te serije: i ovde je radioaktivnost posle 24 sata veća od radioaktivnosti posle 12 i to skoro u istoj srazmeri. To pokazuje da razlika verovatno nije nastala u periodu posle vađenja materijala za analizu, već moguće prilikom unošenja radiofosfora (ali je isto tako moguće da je grupa pacova koja je žrtvovana posle 24 sata sama po sebi imala znatno sporiju progresiju opadanja). Ako kod ove eksperimentalne serije uporedimo progresiju opadanja aktiviteta u krvi i jetri (neorganske frakcije), krivulja opadanja aktiviteta u krvi je nešto brža (strmija) nego u jetrinom neorganskom fosforu. Mada je smanjenje aktiviteta od 100% na 16,7% u krvi već posle 12 sati nenormalno (jer je posle 24 h aktivitet još uvek iznosio 17,1%), ipak je u kasnijim vremenskim intervalima pad aktiviteta u krvi nešto veći nego u neorganskoj frakciji jetre. Generalno uzev, progresija opadanja radioaktiviteta u krvi

TABLICA br. 1

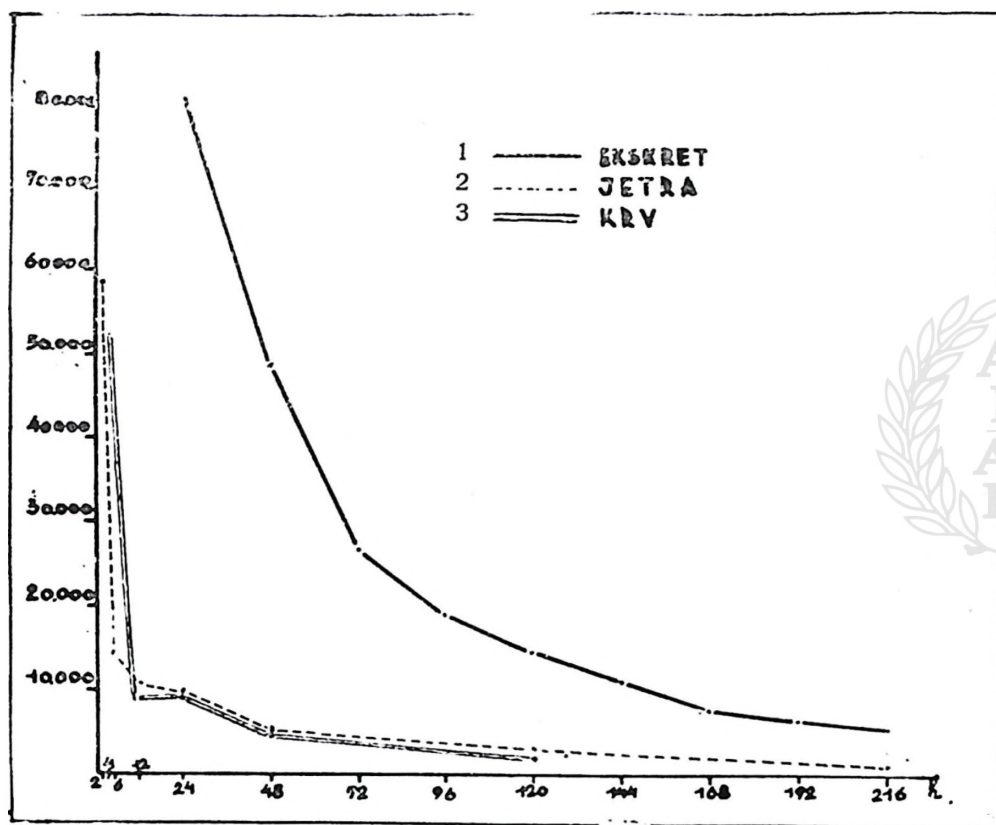
				2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h	264 h	288 h	312 h	336 h	360 h	384 h	408 h	432 h	864 h
I	Apsolutne količine radioaktivnosti	a	Ekskrementi: prosečni aktivitet za 24 h, za jednog pacova					81.042	48.225	25.861	16.003	14.950	6.970	6.701	6.250	5.113	6.175	5.025	5.102	4.166	3.280	5.630	5.220	4.025	4.394	
		b	Jetra: srednja veličina radioaktivnosti neorganskog fosfora u 100 g.	579.812	416.268	142.468	106.650	93.550	67.207	25.878		46.920			14.680	9.587								4.305		2.735
		c	Krv: radioaktivnost neorganskog P u 100 g.		264.000		44.000	45.000	22.700			11.500														
II	Radioaktivnost iskazana u procentima aktiviteta iz prvih vremena	a	EKSKRECIJA					100,—	59,5	31,9	19,8	18,4	8,6	8,12	7,7	6,3	7,6	6,2	6,3	5,14	4,05	6,9	6,4	4,96	5,4	
		b	JETRA	100,—	72,4	24,4	18,4	16,2	11,6	4,5		8,1			2,5	1,65								0,75		0,77
		c	KRV		100,—		16,7	17,1	8,6			4,4														
III	Koeficijent opadanja radioaktivnosti	a	EKSKRECIJA					1,682	1,685	1,79	1,075	2,15	1,040	1,055	1,223	0,828	1,227	0,983	1,225	1,270	0,582	1,08	1,30	0,916		
								5,4																		
		b	JETRA	6,22				1,39	2,59	0,56	3,2		1,51	1,19					1,53							
				4,5				2,0																		
		c	KRV	5,8				1,98																		
								3,9																		

Poređenje kretanja radioaktiviteta neorganskog fosfora u ekskreciji (a), u jetri (b) i u krvi (c) pacova. Upoređuju se za te organe njihove:

- I) Apsolutne veličine aktiviteta (broj beta-impulsa u minutu)
 II) Procentne vrednosti aktiviteta (u odnosu na aktivitet materijala iz najranijeg merenja)
 III) Koeficijenti opadanja radioaktivnosti tokom određenog vremenskog razmaka.

dobro se poklapa sa opadanjem radioaktiviteta neorganske frakcije u jetri, što se na grafikonu br. 2/2 — 2/3 vrlo lepo ispoljava.

Dok smo u prethodnom poglavlju količine izlučenog radiofosfora upoređivali sa unetim količinama, u ovom ćemo poglavlju proučiti kako se količina radioaktiviteta kreće u neorganskim frakcijama fosfora u jetri, u krvi, i u ekskrementima. Ako aktivnosti neorganskog fosfora u ova tri funkcionalna područja međusobno uporedimo u raznim vremenskim razmacima, vidimo da sve tri krivulje radioaktiviteta pokazuju znatan stepen uporediti (vidi grafikon br. 2) tokom onog dela eksperimentalnog perioda u kome smo analizovali kretanje radioaktivnosti u sva tri funkcionalna područja.



GRAFIKON BR. 2

GRAFIČKO UPOREĐENJE KRETANJA APSOLUTNIH VELIČINA RADIOAKTIVNOSTI U EKSKRECIJI, U JETRI I U KRV. Upoređuju se aktiviteti neorganskog fosfora u odnosu na celinu individualnog organizma. Ekskrecija obuhvata ukupne količine radiofosfora izlučenih za svaka 24h. U jetri aktivitet se odnosi na svu količinu neorganskog fosfora u organu (tj. na 10 g. težine organa — 5% telesne težine). Aktivitet krvi odnosi se na celi sadržaj neorganskog fosfora u 20 g. (10C% telesne težine).

Postoji skoro potpuna paralelnost za sve tri krivulje, osobito za krivulju jetre i krvi. U svakom eksperimentalnom vremenu aktiviteti stoje u proporciji 1 : 1, 5—2 : 7—10 (za krv : jetri : ekskreciji).

Paralelnost kretanja radioaktivnosti dobija realniji značaj ako se za upoređenje uzmu vrednosti koje faktički postoje u životinjskoj individui srazmerno stvarnoj veličini organa (odnosno veličini funkcije organa), kao i srazmerno masi tela. U tu svrhu veličine aktiviteta u ispitanim sistemima svodimo na vrednosti proporcionalne masama tih organa. Kao prosečnu težinu krvi čitave individue uzeli smo 10% telesne težine pacova (teškog oko 200 gr. — koliko su naši pacovi težili prosečno) tj. težinu krvi smo označili sa 20 g., a radioaktivnost smo preračunali za tu težinu. Za jetru smo našli da iznosi oko 5% telesne težine, što bi za pacova od 200 g iznosilo oko 10 g. Ovo se potpuno slaže sa podacima saopštenim od strane Ch. Richeta (15). Radioaktivnost jetrinog neorganskog fosfora preračunali smo za prosečnu težinu jetre pojedinog pacova. Ovako preračunate cifre nalaze se u grafikonu br. 2. Izračunati su i koeficijenti koji pokazuju proporcije aktiviteta krvi prema aktivitetu jetre, odnosno proporcije aktiviteta krvi prema aktivitetu ekskrecija. Količnici pokazuju u kakvim se proporcijama neorganski fosfor raspoređuje među ova tri sistema organa u svakom od uporednih vremenskih intervala. Neorganski radiofosfor raspoređen je na čitave mase dva organa u približno podjednakim ekvivalentima, s tim da je u ranom periodu aktivitet u krvi veći nego u jetri, a kasnije su odnosi obrnuti. S obzirom da je masa čitave krvi oko dva puta veća od mase cele jetre, izlazi da krv ima oko 2 do 3 puta manju količinu radiofosfora od jetre jetre po jedinici težine. Ovo bi se donekle slagalo sa gradijentom raspodele fosfora, koji su opisali Cohn i Greenberg (7), jer prema njima jetra po bogatstvu radiofosfora u jedinici mase dolazi na prvom mestu iza kostiju, dok su radioaktiviteti krvi prema istom gradijentu skoro na donjem kraju skale (pre mišića, kože i mozga), gde se nalaze minimalne količine radiofosfora. Međutim u poređenju sa nalazima Hevesya u krvi naših pacova aktivitet fosfora vizavi jetre veći je 1,5 do 2 puta. U tablici br. 1 iskazane su proporcije između sadržaja radiofosfora u krvi i njegove količine u ekskrementima. Izlazi da je količina radioaktivnosti u krvi oko 7—10 puta manja od količine radiofosfora izlučenog u roku od 24 časa (koji prethode vadenju jetre iz organizma.). Ove se proporcije tokom vremena održavaju prilično dosledno. Možda bi bio dozvoljen zaključak da su proporcije raspodele radiofosfora među ova tri organska sistema tokom vremena KONSTANTNE i nezavisne od apsolutne količine radiofosfora u njima, odnosno od vremenskog intervala u kome se mere. Ovo bi važilo barem za vremenske intervale za koje smo sakupili podatke o kretanju radioaktivnosti neorganskog P u krvi (od 4—120h).

S obzirom na stalnu proporcionalnost raspodele radiofosfora među ova tri organska sistema, i na njenu nezavisnost od apsolutne količine radiofosfora u njima, kao i od vremena merenja, nameće se zaključak da to mora proizlaziti iz uporednog i proporcionalnog kretanja radiofosfora u svakom od ova tri sistema organa. U tablici br. 1 izračunati su (i uporedno iskazani) koeficijenti opadanja radioaktivnosti u neorganskom fosforu, posebno za svaki od ova tri organska sistema. U gornjem redu iskazani su koeficijenti opadanja radioaktivnosti u ekskrementima. Ispod toga slede koeficijenti opadanja radioaktivnosti u jetri (neorganska frakcija) i najzad u donjem redu koeficijenti opadanja radioaktivnosti u krvi. Za interval od 4/24h postoje podaci samo za krv i za jetre. Vidi se prilično slaganje tih koeficijenata (krv 5,8, a za jetru 4,5). Za vremen-

ski razmak 24/48h koeficijenti se takođe podudaraju, pri čemu je koeficijent opadanja za krv najveći (što smo istakli u opisu aktiviteta krvi). Koeficijenti opadanja za vremenski raspon 24/120h pokazuju veća odstupanja: za jetru koeficijent opadanja aktiviteta je premalen, dok je za ekskreme previsok. Možda je usled manjeg broja analiza u kasnijim eksperimentalnim vremenima teže donositi zaključke. Prema opisanim podacima postoji utisak da aktivitet u kasnijim periodima za nijansu brže opada u ekskreciji nego u krvi, a u ovoj brže nego u jetri. Ovakav zaključak mora biti donet sa rezervom, jer su aktiviteti u osnovi zadržali proporcije sličnog reda do kraja eksperimenta.

Eksperimenti koji su služili za izučavanje proporcije raspodele radiofosfora među tri sistema organa u telu pacova pokazuju da se sa stanovišta prometa radiofosfora organizam pacova u osnovi ponaša kao jedinstvena sredina, koja srazmerno brzo uspostavlja ravnotežu među svojim organskim sistemima. Kada je jednom uspostavljena, ova se ravnoteža relativno stabilno održava, nezavisno od kretanja apsolutne količine radiofosfora u organizmu. To se ispoljava kako u održavanju približno stalnih proporcija raspodele radiofosfora među sistemima, tako i u bliskim koeficijentima opadanja radoaktivnosti u tri sistema ispitanih organa (krv, jetra i ekskrecija). Verovatno je da se ove konstante održavaju posredstvom krvne cirkulacije koja neprekidno posreduje među svim sistemima. Kako se fosfor stalno gubi iz krvi najpre odlaskom u koštani sistem a zatim ekskrecijom, gubitak se veoma brzo prenosi i na sve organe koji su u ravnoteži sa krvlju.

Proučavanje proporcije raspodele, s jedne strane, i koeficijentata opadanja radioaktiviteta u vremenskim intervalima, s druge strane, omogućuje da se sagledaju određene pravilnosti u metabolizmu radiofosfora. Pokazalo se da čitav promet radiofosfora biva ostvaren na korelativan način: sve promene u ma kom delu organizma proporcionalno se održavaju u ostalim njegovim delovima.

3. Kretanje radioaktivnosti u fosforu organskih frakcija iz jetre

U prethodnom poglavlju je ustanovljeno da između prometa neorganskog fosfora u tri ispitana sistema organa (krv, jetra i ekskrecija — tj. funkcije bubrega i creva) postoje stalne kvantitativne korelacije. One se ispoljavaju s jedne strane u uspostavljanju stalnih proporcija raspodele radiofosfora među te organe, a s druge strane u jednakim koeficijentima opadanja radioaktivitetima u tim sistemima organa tokom vremena.

U ovom poglavlju možemo pristupiti posebnoj analizi kretanja radiofosfora kroz sistem metabolizma organskih fosforovih jedinjenja u jetri pacova. Radioaktivni fosfor kod peroralnog unošenja inače iz creva najpre dospeva u jetru. Stoga jetrini organski spojevi mogu najranije reagovati sa radiofosforom iz portalne krvi, koja u početku verovatno donosi veće koncentracije nego krv iz opšte cirkulacije.

Kako sinteze ćelijskih sastojaka u organima neprekidno teku, to će sa porastom intracelularne količine radiofosfora P^{32} uskoro doći do njegovog ugrađivanja u organske frakcije, i to u sličnoj srazmeri u kojoj je prisutan u intracelularnoj neorganskoj frakciji. Pošto organske frakcije do početka eksperimenta (tj. do trenutka unošenja radiofosfora) sa-

drže samo obični, tj. neradioaktivni fosfor (kao i čitav organizam, uostalom), to će zasićenje njihovog fosfora radiofosforom nastupiti utoliko kasnije, ukoliko se sintezom neka fosforova frakcija sporije obnavlja. Kad radiofosfor u organskim spojevima dostigne istu proporciju koju ima u neorganskoj, tada će se obe fosforove komponente (radioaktivni i obični — neradioaktivni fosfor) u organskim jedinjenjima morati obnavljati u proporciji u kojoj već postoje u neorganskom fosforu (10).

Tablica broj 2 kao i grafikoni 3, 4 i 5 sadrže podatke o kretanju radioaktivnosti fosfora tokom vremena, izolovanog iz pojedinih organskih jedinjenja jetre pacova. U tablici br. 2 izneti su podaci o apsolutnim veličinama radioaktivnosti svih proučenih frakcija u pojedinim serijama i različitim vremenima. Podaci za frakcije dati su posebno za svaku seriju i odvojeno za svako vreme (vidi tablicu br. 2). Serije su raspoređene jedna ispod druge, po vertikalnom redosledu, dok su vremena raspoređena po horizontalnom redosledu. Za svaku seriju radioaktivnosti su stavljene u rubrici za ono vreme u kome su žrtvovane životinje.

U tablici 3/A ponovo su iskazani apsolutni podaci iz tablice br. 2, u zajedničkom tabelarnom poretku serija i vremena, dok su u tablici 3/B ove apsolutne vrednosti preračunate u procenat veličine prema određenom kriterijumu. Procentno iskazivanje vrednosti radioaktiviteta ima zadatak da prikaže proporcije raspodele radiofosfora u pojedinim frakcijama unutar određenog vremena. Kao osnova za 100% uzeta je radioaktivnost neorganske frakcije fosfora datog vremenskog intervala, dok su procenti organskih frakcija u istome intervalu obračunati prema veličini neorganske frakcije toga vremena. Time je omogućeno da se uporede po istome kriterijumu radioaktivnosti raznih frakcija jednog perioda, nezavisno od stepena opadanja radioaktivnosti duž vremenske osovine, odnosno nezavisno od različitih apsolutnih veličina radioaktivnosti u istom vremenu kod životinja iz raznih eksperimentalnih serija.

a) — Apsolutne veličine radioaktivnosti tokom vremena u pojedinim serijama. U toku vremena krivulja radioaktivnosti svake frakcije dostigne (posle unošenja radioaktivnosti) izvesni maksimum, a zatim postepeno opada, što odgovara napred opisanom ponašanju neorganske frakcije u jetri (vidi grafikone 3, 4 i 5). Apsolutne veličine variraju dakle ne samo unutar neorganskih frakcija jetre (kao radioaktivne sirovine za sinteze ostalih radioaktivnih fosfornih jedinjenja u jetri), već u odgovarajućoj srazmeri radioaktivnosti variraju i u grupi organskih fosfornih frakcija.

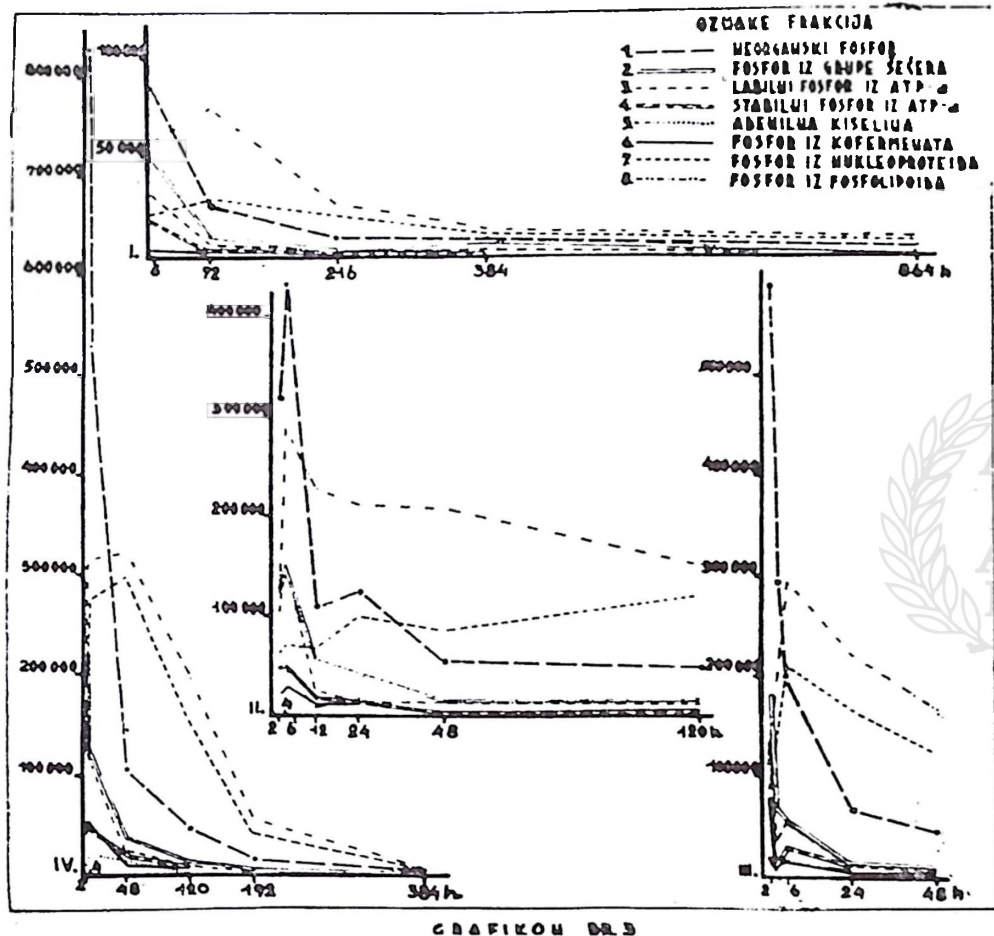
U prethodnom poglavlju pokazano je da je maksimum radioaktivnosti u neorganskoj frakciji dostignut već posle dva časa (svega u drugoj seriji dostignut je tek posle četiri sata). Kod nukleoproteida i fosfolipida maksimum radioaktivnosti postignut je znatno kasnije (u svim eksperimentalnim serijama). U ostalim organskim frakcijama, maksimum je uvek dostignut u ranim satima eksperimentisanja. Uporedo sa krivuljom opadanja radioaktivnosti neorganske frakcije, kreću se i krivulje radioaktiviteta šećerne grupe, labilne frakcije fosfora iz ATP-a, kao i aktiviteti stabinolg fosfora iz ATP-a (vidi grafikon 4 i 5). Fosfor iz adenilne kiseline i fosfor iz kofermenata u prvim satima nemaju sasvim uporedne vrednosti sa neorganskom radioaktivnošću, jer nešto zakašnija-

TABLICA br. 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Naziv frakcije	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	192 h	216 h	384 h	864 h
I Serija	Neorganski P			84.336				25.875			9.587	7.102	2.735
	Ukupni P iz šećera			49.679				9.438			2.141	7.710	990
	Labilni P iz ATP			31.066				5.278			2.100	2.014	498
	Stabilni P iz ATP			17.533				2.639			1.300	504	263
	P iz adenil. kis.			4.830				3.508			848	591	271
	P iz kofermenta			4.225				2.287			742	555	213
	P iz nukleoproteida			20.300				28.975			21.340	11.340	5.520
	P iz fosfolipoida			57.600				74.000			26.825	18.800	7.317
II Serija	Neorganski P	326.937	427.775		106.656	122.000	54.600		47.666				
	Ukupni P iz šećera	126.264	144.165		54.852	41.431	13.800		15.115				
	Labilni P iz ATP	107.133	147.700		24.100	13.150			11.637				
	Stabilni P iz ATP	45.695	47.622		18.829	12.849	1.740		3.700				
	P iz adenil. kisel.	43.695	43.322		8.067	14.040	1.520		3.472				
	P iz kofermenta	19.810	29.336		10.583	13.010	3.433		3.148				
	P iz nukleoproteida	60.850	69.400		66.583	98.600	85.600		119.933				
	P iz fosfolipoida	114.060	287.000		235.200	210.000	205.000		150.050				
III Serija	Neorganski P	587.000	291.330	198.600		65.100	41.025						
	Ukupni P iz šećera	181.935	65.700	55.100		10.555	9.638						
	Labilni P iz ATP	136.700	37.060	53.200		10.300	4.221						
	Stabilni P iz ATP	78.400	11.456	27.000		7.200							
	P iz adenil. kisel.	19.450	18.100	16.660		6.100							
	P iz kofermenta	20.167	12.400	13.800		5.965	2.545						
	P iz nukleoproteida	86.000	148.500	208.000		166.000	121.175						
	P iz fosfolipoida	115.000	220.665	260.400		272.000	165.500						
IV Serija	Neorganski P	825.500	529.700				105.700		46.775	14.680		1.509	
	Ukupni P iz šećera	223.683	124.984				36.930		13.672	4.775		407	
	Labilni P iz ATP	177.333	124.885				24.350		9.215	2.551		472	
	Stabilni P iz ATP	136.000	47.167				20.200		7.883	1.665		155	
	P iz adenil. kisel.	30.634	22.967				14.170		2.702	1.265		111	
	P iz kofermenta	36.479	52.055				11.360		4.787	750		149	
	P iz nukleoproteida	187.000	275.875				297.800		157.025	41.350		4.612	
	P iz fosfolipoida	231.600	314.500				312.000		199.000	56.900		4.850	

RASPODJELA RADIOFOSFORA MEĐU FRAKCIJAMA U POJEDINIM SERIJAMA. Svi aktiviteti pretstavljeni su u apsolutnim vrednostima (brojem B-zračenja u 1 minutu).

vaju. Međutim u kasnijim periodima (tj. posle 6h) i one uspostavljaju takođe određenu paralelnost sa neorganskom frakcijom. Šećerni fosfor a isto tako i labilni i stabilni fosfor iz ATP-a dostigli u su našim eksperimentima maksimum kada i neorganski P, tj. već posle 2h, dok su maksimumi fosfora iz adenilne kiseline i iz kofermenta dostignuti kasnije, tj. posle maksimuma neorganske frakcije: ovi se maksimumi po pravilu postižu tek oko 4 sata posle unošenja P^{32} .

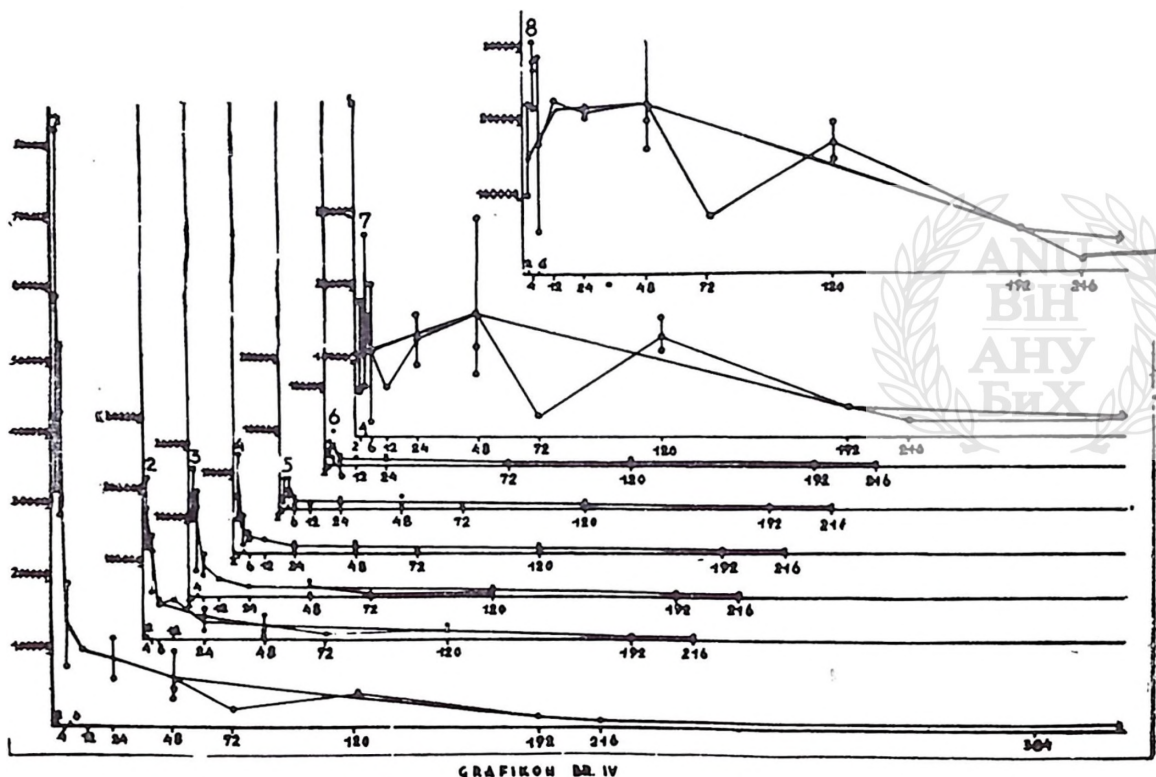


GRAFIČKI PRIKAZ KRETANJA RADIOFOSFORA U ORGANSKIM FOSFOROVIM JEDINJENJIMA U JETRI PACOVA

Kod fosfolipoida samo je jedna serija dostigla maksimum apsolutne veličine radioaktivnosti tek posle 72 sata, dok je kod ostalih serija apsolutna veličina radioaktivnosti fosfolipoida ostvarena rano, tj. posle četiri sata od unošenja radiofosfora. Najraniji maksimum kod nukleoproteida nađen je u III-IV seriji i to posle 6h a najkasnije posle 120h (II serija).

b) Progresije opadanja radioaktivnosti. U grafikonu br. 3 prikazana su 4 posebna sistema krivulja o kretanju radioaktiviteta svih frakcija. Za svaku eksperimentalnu seriju izrađen je sopstveni sistem krivulja. Vidi se da su kretanja radioaktivnosti pojedinih frakcija u svakoj posebnoj seriji principijelno sličnog reda. Ipak postoje dve grupe odstupanja u krivuljama istih frakcija u raznim serijama. Najpre postoje znatne razlike apsolutnih veličina maksimuma radioaktivnosti. Drugo, postoje razlike u vremenu postizanja maksimuma, odnosno u tipu kretanja krivulje pre i posle maksimuma. Uprkos svega toga opšti izgledi grafikona u sve četiri serije veoma se podudaraju.

U grafikonu br. 4 izvršeno je sažimanje posebnih krivulja pojedinih frakcija iz raznih serija u zajedničku krivulju te frakcije. Ovim se za krivulju jedne frakcije dobije veći broj analitičkih podataka kako za pojedinačna vremena, tako i za popunjavanje podataka u međuvremenima.



U osam koordinatnih sistema izrađeno je osam zajedničkih krivulja iz podataka sa posebnih krivulja iz grafikona br. 3. Za svaku frakciju upotrebljeni su podaci o veličinama radioaktivnosti za sva vremena. Zatim je za svako analitičko vreme nadena srednja vrednost. Srednje vrednosti za susedna vremena spojena su pravim linijama. Tako su dobijene krivulje koje pokazuju manja ili veća odstupanja od generalne linije. Najveća odstupanja su u frakcijama nukleoproteida i fosfolipoida. Znatno manja su odstupanja u neorganskoj frakciji. U ostalim frakcijama odstupanja su minimalna. Onda je za svaku frakciju izvučena generalna linija, koja se kreće po sredini maksimalnih odstupanja za pojedina vremena.

Oznake frakcije (brojevi) su iste kao i u grafikonu br. 3.

S obzirom da su posebne krivulje pojedinih eksperimentalnih serija imale u osnovi podjednak opšti izgled i raspored za odgovarajuće frakcije, očekivali smo da će i zajednička krivulja za odgovarajuću frakciju biti principijelno slična matičnim krivuljama iz svojih serija. U grafikonu broj 4 postavljeno je 8 koordinacionih sistema: svaki za jednu frakciju. Već prvi pogled na 8 posebnih krivulja otkriva tipične činjenice. Opšti pravac krivulja odlično se poklapa sa srednjim statističkim vrednostima u onim vremenima za koje su postojale grafičke tačke iz najmanje tri serije. Izuzetak od toga nalazimo samo u dva slučaja. Kod nukleoproteida i fosfolipoida srednje vrednosti za period od 4h premašuju opšti pravac krivulje. Ostale 22 grafičke tačke za srednje vrednosti radioaktivnosti (izračunate iz po tri eksperimentalne serije) potpuno se uklapaju u opšti smer krivulje. Najslabije slaganje nalazi se u slučajevima gde podatak za zajedničku krivulju potiče iz analize samo u jednoj seriji. Tako napr. za period od 12h u svim frakcijama je dobio po jedan podatak azanalize druge eksperimentalne serije. Od 8 frakcija ovog vremena samo u tri slučaja ova se vrednost sasvim uklapa u zajedničku krivulju. Najgori je slučaj sa podatkom iz sedamdeset drugog sata. On se uklapa dobro u zajedničku krivulju samo u frakciji kofermenata. U ostalih 7 frakcija ovaj podatak upadljivo štrči izvan opšteg toka krivulje frakcija.

Kako se većina srednjih veličina dobivenih iz po tri ili dve serije, kao i izvestan broj iz po jedne jedine serije, dobro uklapa u zajedničku krivulju frakcije, bilo je moguće konstruisati relativno verne pravce kretanja radioaktivnosti za sve frakcije (vidi grafikon br. 4) tokom eksperimentalnog vremena.

U grafikonu br. 5 ucrtani su u zajedničkom koordinatnom sistemu samo opšti tokovi krivulja svih frakcija iz grafikona br. 4.

Već i u grafikonu br. 4, a osobito u grafikonu br. 5, može se ustanoviti da postoje tri različita opšta tipa kretanja krivulja radioaktivnosti u toku vremena. Najpre jedan tip vidimo u grupi frakcija neorganskog i šećernog fosfora kao i u labilnom i stabilnom fosforu ATP-a. Ove četiri frakcije imaju skoro istovetan opšti izgled krivulja radioaktivnosti. One se međusobno razlikuju skoro jedino po apsolutnim veličinama aktiviteta u istim vremenskim periodima.

Drugi tip krivulja nalazi se u fosforu frakcija adenilne kiseline i kofermenata. U krivuljama ovih dveju frakcija radioaktivnost se nalazi u porastu do perioda od oko 4h. Posle toga sledi skoro paralelan hod s krivuljama već pomenute grupe od četiri frakcije.

Najzad sasvim svojstven tip razvitka krivulje radioaktivnosti pokazuje fosfor iz nukleoproteida i fosfolipoida.

Kod nukleoproteida maksimum se dostiže oko 48h. Nije isključen i raniji maksimum, ali nije verovatno da bi mogao biti pre 24h. Kod fosfolipoida na osnovu opšteg toka krivulje kao i na osnovu rasporeda tačaka — radioaktivnosti maksimum bi mogao ležati između 12—15h i 30—40h. Kasnije ćemo izneti metod koji smo upotrebili za tačnije određivanje momenta zasićenja frakcije. Ova bi tačka principijelno morala biti u blizini apsolutnog maksimuma radioaktiviteta frakcije.

c) Raspodela ukupne količine radiofosfora među jetrinim frakcijama unutar pojedinog vremenskog perioda pokazana u tablici br. 3/B gde su kao 100% uzeti aktiviteti neorganske frakcije svakog pojedinog

intervala. Vidi se da je procentna raspodela radiofosfora među organskim frakcijama u svakom vremenskom intervalu podjednaka, izuzev za prve sate, kada ravnoteža zasićavanja radiofosforom još nije dostignuta u u svim frakcijama. U grupi acidsolubilnih frakcija najveća količina radioaktivnosti nađena je u neorganskoj frakciji. Unutar organskih acidsolubilnih frakcija najveći aktivitet nalazi se u grupi šećernog fosfora, mada još uvek oko 3 puta manji od neorganskog aktiviteta. Zatim po veličini aktiviteta dolazi labilna frakcija fosfora iz ATP sa iznosom radioaktiviteta između četvrtine i petine aktiviteta neorganske frakcije. Dalje po veličini sledi radioaktivnost stabilnog fosfora iz ATP, koja se kreće oko $1/10$ do $1/8$ aktiviteta neorganske frakcije. Najzad, sa približno podjednakim iznosima, dolazi fosfor iz adenilne kiseline i iz kofermenata, čineći najniže vrednosti radioaktivnosti u grupi acidsolubilnih frakcija, a iznoseći manje od desetine, te više od šesnaestine aktiviteta neorganske frakcije.

Kod nukleoproteida i fosfolipoida prosečna veličina radioaktiviteta posle zasićenja frakcije radiofosforom dostiže oko 2,5—3 puta veće vrednosti od aktiviteta neorganske frakcije. Upadljivo je da se ovaj visoki prosek dostiže znatno kasnije nego kod ma koje druge frakcije. Od svih podataka iz istog vremenskog intervala (ali od raznih eksperimentalnih serija) uzeli smo srednju aritmetičku veličinu. U naslovu tabele br. 3 za svaki vremenski interval naznačeno je iz kojih serija su uzeti podaci.

U tabeli 3/B data je procentna raspodela radiofosfora među jetrinim frakcijama za razne vremenske intervale. Tako napr. aktivitet šećernog fosfora iznosi prosečno 32,2% neorganskog aktiviteta s relativno dobrim podudaranjem u svim vremenima: veće odstupanje i s p o d proseka nalazi se samo u vremenskom intervalu od 216 sati (22,3%), dok veće odstupanje i z n a d proseka nalazimo u vremenskom intervalu od 12 sati (51,5%). U ostalim vremenima vrednosti se obično kreću između 25% i 36%. Nešto veća odstupanja nalazimo u labilnom fosforu iz ATP, dok su odstupanja oko srednje vrednosti kod stabilnog fosfora iz ATP-a, kao i u fosforu iz adenilne kiseline, odnosno iz kofermenata, manje nego u šećernoj frakciji. U fosforu iz adenilne kiseline i iz kofermenata ispod proseka su aktiviteti iz prva dva vremenska intervala (2 i 4h). Kod nukleoproteida i fosfolipoida prosečna vrednost nastaje tek počev od 48 sati.

U poslednjem stupcu tabele 3/B (kolona 14) nalaze se prosečne veličine radioaktivnosti za eksperimentalna vremena posle 48 h, a iskazane su u procentima neorganskog aktiviteta. Vidi se da je prosečna procentna veličina radioaktivnosti šećernog fosfora za čitavi eksperimentalni period ravna približno trećini radioaktivnosti neorganske frakcije. Aktivnost labilnog fosfora iz ATP za jednu trećinu je manja od aktiviteta šećernog fosfora, odnosno čini nešto više od petine aktivnosti neorganske frakcije. Stabilni fosfor iz ATP nosi svega deset procenata aktivnosti neorganske frakcije, ili oko polovinu aktivnosti labilnog fosfora iz ATP. Aktiviteti u fosforu adenilne kiseline odnosno u fosforu kofermenata iznosi 7,9% odnosno 7,2% od aktiviteta neorganskog fosfora. Procentna veličina radioaktiviteta nukleoproteida iznosi 249,5% aktiviteta neorganske frakcije kod postignute ravnoteže, dok analogna veličina za fosfolipoida iznosi 305,7%.

TABLICA br. 3

Časovi žrtvovanja	2 h	4 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	192 h	216 h	384 h	864 h	Prosečne vrednosti
Ekspirimen. serije	I + II + III	I + I + IV	I + III	II	II + III	II + III	I	II + IV	IV	I	I + IV	I	
Broj anal. pacova	12	12	7	4	8	12	4	8	4	4	8	4	

A

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	14
Neorganski P	579.812	416.268	142.468	106.656	93.550	67.108	25.875	46.920	14.680	9.587	4.305	2.735
Ukupni P iz šećer.	177.264	121.583	52.389	54.852	25.493	21.122	9.438	14.366	4.775	2.141	4.058	990
Labilni P iz ATP	137.055	103.325	42.133	24.100	11.725	14.285	5.278	10.366	2.551	2.100	1.243	498
Stabilni P iz ATP	90.847	35.325	18.666	18.829	10.025	9.670	2.639	5.791	1.665	1.300	329	263
P iz adenil. kisel.	35.360	28.796	10.795	8.067	10.070	6.845	3.058	3.087	1.265	848	351	271
P iz kofermenata	27.485	31.270	9.012	9.583	7.487	5.779	2.287	3.068	800	742	252	213
P iz nukleoprot.	111.283	164.591	119.150	66.833	134.300	168.158	28.975	138.479	41.350	21.340	7.976	5.520
P. iz fosfolipoida	163.508	274.022	154.000	235.200	241.000	227.500	74.000	174.525	56.900	26.825	8.825	7.317

B

Neorganski P	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—	100,—
Ukupni P iz šećer.	30,6	29,5	37,0	51,5	25,1	31,8	36,6	30,9	32,6	23,3	25,4	32,1
Labilni P iz ATP	23,6	23,5	29,6	22,7	13,3	21,4	20,4	22,2	17,5	21,9	29,8	18,2
Stabilni P iz ATP	15,1	7,9	13,1	8,2	10,7	14,3	10,2	12,5	7,2	13,5	8,6	9,9
P iz adenil. kisel.	6,1	6,8	7,6	7,6	10,8	10,2	11,8	6,8	8,6	8,8	7,8	8,1
P iz kofermenata	4,7	7,4	6,4	9,0	8,0	8,6	7,8	6,5	5,8	7,7	6,2	7,8
P iz nukleoprot.	18,8	39,5	61,2	62,8	170,4	252,0	111,—	297,8	283,—	213,—	235,7	203,—
P. iz fosfolipoida	28,3	65,5	108,0	222,—	258,—	358,0	286,—	363,5	—	276,—	257,5	258,—
												305,7

PROSEČNA RASPODELA RADIOFOSFORA MEĐU FRAKCIJAMA U JETRI PACOVA

A — apsolutne količine radiofosfora u frakcijama. Vrednosti ustanovljene sumiranjem cifara iz tablice br. 2 i de-
ljenjem sa brojem eksperimentalnih grupa u istom eksperimentalnom vremenu.

B — procentne veličine su ustanovljene deobom apsolutne količine radiofosfora frakcije sa apsolutnom količinom ne-
organskog fosfora toga vremena, i množenjem dobivenog broja sa 100.

Vidimo da se tokom vremena ispoljavaju karakteristična kretanja radioaktivnosti unutar organskih frakcija jetre, koja se mogu formulirati na sledeći način (uporedi sa grafikonom br. 5).

1) Apsolutna veličina radioaktivnosti dostiže kod svake organske frakcije najpre određeni maksimum. Vrlo brzo dostižu maksimume (uporedo sa neorganskom frakcijom) šećerni fosfor i fosfor iz labilne i stabilne frakcije ATP. Sporije nastaje maksimum u frakcijama fosfora iz adenilne kiseline i iz kofermenata. Sasvim sporo u fosforu iz fosfolipoida, a najsporije u fosforu nukleoproteida.

2) Posle dostignutog maksimuma, apsolutna vrednost aktiviteta svake frakcije opada brže ili sporije, prema prirodi same frakcije. Najveća brzina opadanja radioaktivnosti u organskim frakcijama posle maksimuma nađena je u fosforu iz šećerne grupe, odnosno u stabilnom i labilnom fosforu iz ATP. Veličina radioaktivnosti najsporije opada u nukleoproteidskom fosforu, a samo neznatno brže u fosforu iz fosfolipoida. Radioaktivnost fosfora iz adenilne kiseline i iz kofermenata opada znatno brže od aktiviteta u koloidnim organskim frakcijama, a sporije od aktiviteta u ostalim acidsolubilnim frakcijama.

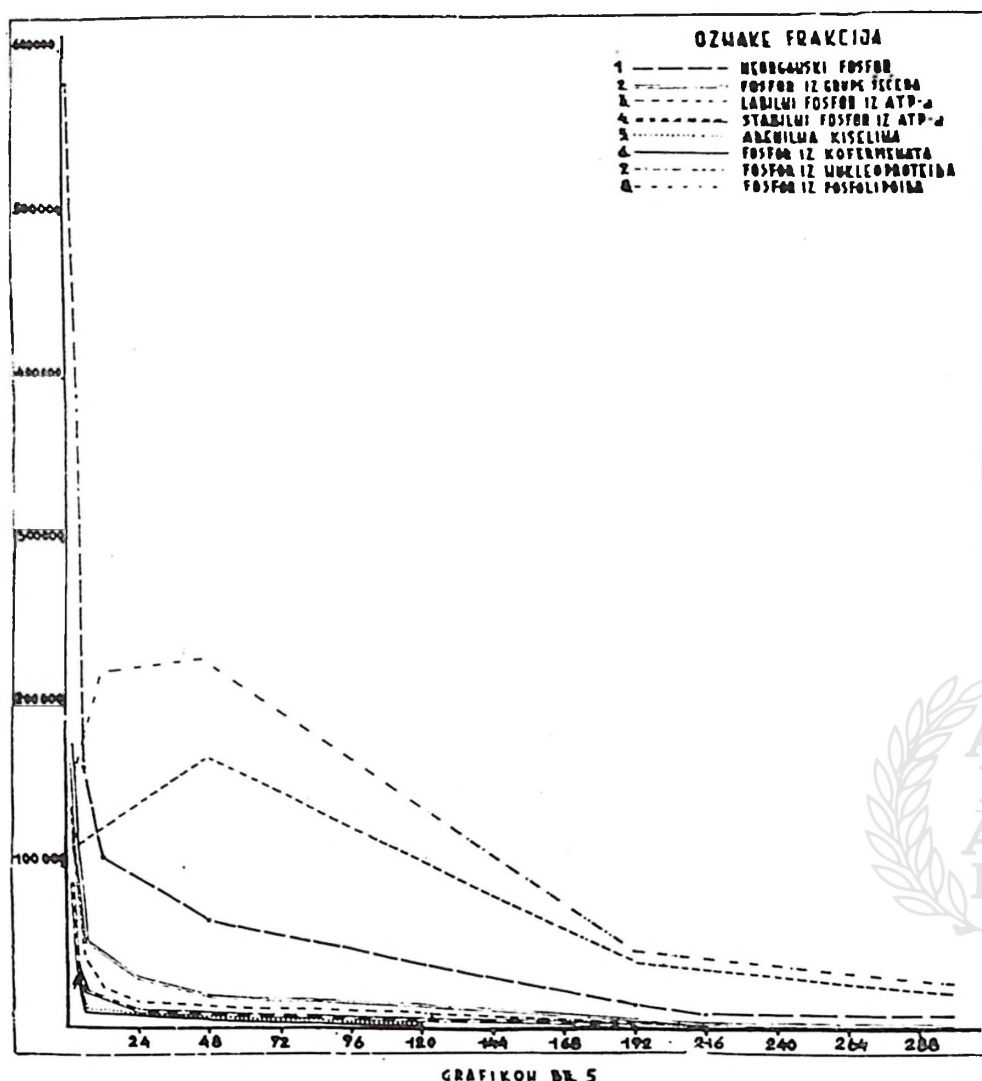
3) Najveće apsolutne iznose radioaktivnosti srećemo u frakcijama neorganskog fosfora, u fosforu iz nukleoproteida i fosforu iz fosfolipoida. Najmanje apsolutne veličine radioaktivnosti nalaze se u frakcijama fosfora iz adenilne kiseline i iz kofermenata. Ostale frakcije zauzimaju srednje apsolutne vrednosti između pomenutih (vidi grafikon br. 5).

4) Radioaktivnost neorganske frakcije dostiže u prvim satima tako visoke apsolutne iznose koje nikada ne dostiže nijedna od organskih frakcija. Iza neorganske frakcije najveći maksimumi aktivnosti fosfora postignuti su u fosforu fosfolipoida, koji dostižu ipak samo 38% od veličine maksimuma neorganske frakcije fosfora. Mada i apsolutni aktiviteti nukleoproteidskog fosfora dostižu velike iznose, nikada ne premašuju trećinu maksimuma apsolutnog aktiviteta neorganske frakcije (pogledaj grafikone: 3, 4 i 5).

5) Tokom prvih sati eksperimenata neorganska frakcija poseduje ne samo najveće apsolutne već i najveće relativne iznose radioaktiviteta. Pošto apsolutna radioaktivnost neorganske frakcije opada brže od nekih organskih, to već posle 6 sati apsolutna veličina neorganskog aktiviteta biva premašena napr. intenzitetom radioaktivnosti fosfolipoida, što u suštini ostaje do kraja eksperimenta. Slično stoje stvari i sa nukleoproteidima, samo što se izjednačenje apsolutne radioaktivnosti njihovog fosfora sa aktivitetom neorganske frakcije postiže tek za 10—12 sati posle unošenja radiofosfora (vidi grafikon br. 5).

6) Praćenje krivulja radioaktivnosti pokazuje zanimljive rezultate. Upadljiva su tri tipa krivulja. Prvi tip nalazimo u neorganskoj frakciji. Po tome tipu kreću se i aktiviteti u grupi šećernih frakcija, labilnog i stabilnog fosfora iz ATP-a. Drugi tip krivulja nalazi se u fosforu iz adenilne kiseline i kofermenata. Treću grupu krivulja radioaktivnosti pokazuju nukleoproteidi i fosfolipoidi (uporedi grafikone br. 3, 4 i 5).

7) Procentna raspodela radioaktivnosti među razne frakcije u pojedinim vremenskim intervalima zavisi od trajanja eksperimenta, odnosno od toga da li su merenja vršena u ranijim ili kasnijim vremenskim intervalima posle unošenja radiofosfora. Sume relativnih (procentnih) veličina radioaktiviteta analizovanih frakcija rasla je do trenutka uspo-



U zajednički koordinativni sistem prenete su krivulje (samo generalne linije) svih frakcija iz grafikona br. 4. Dok se u grafikonu br. 4 mogu uočiti samo tipovi krivulja pojedinih frakcija, u grafikonu br. 5 su pristupačne analizi i proporcije raznih frakcija u pojedinim vremenskim periodima.

stavljanja ravnoteže. Posle toga zbir je do kraja eksperimenta ostao približno isti. Dok u prvim satima aktivitet neorganske frakcije premašuje i apsolutno i relativno sve aktivite organskih frakcija, dotle u kasnijim satima ovaj premasaj veličine radioaktivnosti neorganske frakcije biva sačuvan do kraja eksperimenta samo u odnosu na acidsolubilne organske frakcije. Naprotiv, u odnosu na fosfolipoide i nukleoproteide, stvari se obrću tako da ove frakcije u kasnijim vremenskim intervalima (fosfolipoidi počev od 6h, a nukleoproteidi počev od 12h) pokazuju i apsolutno i relativno veće aktivite od neorganskog fosfora jetre, što ostaje do kraja eksperimenta.

8) Posle uspostavljanja ravnoteže prenošenja fosfora, postiže se približno konstantna procentna raspodela aktiviteta među pojedine frakcije unutar svakog vremenskog intervala (sa manjim ili većim kolebanjima), tako da se aktiviteti frakcije održavaju do kraja eksperimenta u određenim međusobnim proporcijama (vidi tablicu br. 4/B).

9) Ravnoteža raspodele radiofosfora nastaje verovatno kada specifični aktiviteti date frakcije dostignu istu veličinu kao u neorganskoj frakciji (ova je u krajnjoj liniji služila kao sirovina za sintezu svih organskih fosfornih frakcija). Ravnoteža ne nastupa istovremeno u svim frakcijama. Najranije se postiže ravnoteža u frakciji šećera, labilnog i stabilnog fosfora ATP-a, nešto sporije u fosforu adenilne kiseline i kofermenata. Relativno mnogo sporije dolazi do ravnoteže u frakciji fosfolipida, a najsporije u frakciji nukleoproteida.

C) — ANALIZE OBIČNOG NEAKTIVNOG FOSFORA P^{31} U FRAKCIJAMA JETRE

Uporedo sa analizama radioaktivnosti izveli smo i hemijska kvantitativna merenja neaktivnog fosfora u fosforovim frakcijama (izuzev u propandiolfosfatu) u svim jetrama od devedeset i jednog pacova (kojima smo inače kao indikator za praćenje metabolizma prethodno bili dali radioaktivni P^{32}). Nalazi dobiveni ovim analizama izneti su u tablici br. 4. U nekim rubrikama tablice postoje praznine, koje su nastale kao posledica tehničke greške (prskanja epruveta u centrifugi, usled prevremenog bacanja neanalizovanog materijala omaškom laboranata, preturanjem posude s arastvorom i sl.) te sada nedostaju podaci za odgovarajuće frakcije u datim grupama iz nekih eksperimentalnih serija. Pošto je broj izvedenih analiza veliki, taj delimični nedostatak pokriva se vrednostima drugih serija za iste frakcije. Svaka cifra u priloženoj tablici predstavlja srednju vrednost dobivenu od po četiri pacova jedne grupe date serije, izuzev grupe A u prvoj seriji, gde je prilikom davanja izotopnog P^{32} jednom pacovu iscurio deo aktivnog fosfora iz sonde, te je životinja odmah eliminisana iz dalje analize (jer se nije moglo ustanoviti kolika je doza stvarno uneta u životinju). Pošto količine neaktivnog fosfora ne zavise od vremena proteklog između davanja radioaktivnog P^{32} i žrtvovanja pacova, u ovim tablicama ne postoje oznake eksperimentalnog vremena.

Pomoću kolorimetrijskih analiza utvrđeno je da količina neorganskog fosfora u jetri pacova najčešće iznosi između 20 i 30 mg. na 100 g sveže jetre. Međutim, ređe postoje i znatnija odstupanja prema višim i prema nižim vrednostima. Najveće odstupanje prema visokim vrednostima (38,5) nalazi se u grupi G, druge serije, dok je najmanja vrednost nađena u grupi S četvrte serije (8,05). Prosečna vrednost neorganskog fosfora iz analize jetara od devedeset i jednog pacova iznosi 25,69 mg na 100 g sveže jetre. Srednje aritmetičko odstupanje iznosi $\pm 6,14$, srednje kvadratno odstupanje $\pm 7,6$, a standardna devijacija $\pm 1,22$.

S obizrom da smo za izolovanje acidsolubilnih frakcija upotrebili tehniku po J. Sachs,u,animalo nas je da vidimo kako se naši rezultati za obični neaktivni fosfor slažu sa Sachsovima (16). Kod njegovih dveju rasa laboratorijskih pacova (Carworth i Sprague Dawley) neorganski fosfor u jetri iznosi skoro za jednu trećinu manje od našeg (18,5 i 19,2

Tablica br. 4
NEAKTIVNI P

Naziv frakcije	I Serija					II Serija						III Serija					IV Serija						V Serija	Srednja vrednost	
	A	B	C	D	E	F	G	I	K	J	H	E	F	G	H	I	J	S	R	K	L	M	A	%	Apsolutna
Neorganski P	25,67	30,6	21,47	35,2	37,6	28,76	38,57	27,28	28,0	21,77	28,8	35,0	—	17,9	19,9	13,7	19,0	8,05	25,12	20,60	27,0	35,0	26,2	100,—	25,69
Ukupni šećer. P	10,07	15,14	5,02	—	8,23	9,62	12,64	6,91	6,49	4,56	12,63	7,8	6,4	5,71	9,17	8,43	5,51	6,76	—	4,33	—	—	8,92	32,9	8,43
A. T. P. labilni — P	8,50	4,83	3,8	5,30	6,02	5,57	3,85	2,58	6,32	—	—	8,5	5,63	—	2,16	3,76	2,56	7,87	5,22	4,04	—	9,2	5,07	20,5	5,55
A. T. P. stabilni — P	5,75	2,57	3,48	3,09	4,90	2,7	3,8	1,7	1,6					—	—	8,35	1,8	4,29	3,89	2,4	—	7,7	7,3	16,1	4,34
P iz adenil. kis.	1,44	3,52	1,28	1,28	1,33	2,9	4,38	1,58	1,32		1,56	2,3	3,8	1,89	1,15	3,6	2,5	—	—	1,4	2,9	3,76	2,5	9,4	2,43
P iz kofermenata	1,169	2,13	1,75	1,154	1,43	1,64	1,345	1,832	1,404	0,895	2,53	3,1	5,3	1,99	8,4	3,8	4,5	4,9	1,9	1,6	—	2,9	4,62	10,3	2,64
P iz nukleoprot.	83,—	46,85	83,0	97,1	29,89	126,0	93,35	117,4	108,4	99,93	116,5	67,3	94,5	53,46	101,8	46,2	97,0	83,18	81,2	50,6	—	102,0	83,7	320,0	83,5
P iz fosfolipoida	59,23	81,93	30,56	32,23	115,7	103,2	138,0	141,8	130,0	144,0	153,8	81,6	57,3	57,0	59,6	95,—	262,0	128,1	46,2	121,5	32,7	29,7	92,35	356,0	94,81
Ukupni P u jetri	194,83	187,37	150,16	186,27	204,10	270,39	295,93	301,08	283,53	271,15	315,82	205,6		137,95	172,18	182,84	394,87	243,15	183,53	206,47		190,16	230,65		228,34

Količine običnog — neradioaktivnog — fosfora (P^{31}) na 100 gr jetre pacova. Ispitano u 91 pacova ($22 \times 4 \times 3$).

mg⁰/₀), a i oscilacije su mu manje od naših (13,1 — 23,9 odnosno 14,4 — 26,4 mg⁰/₀). Dakle, u nas postoji niži minimum i viši maksimum nego u Sachsa, a srednja vrednost u našim pacovima je za 31% veća od njegove srednje vrednosti (16). Da li su to samo posledice tehničkih grešaka u našem radu, ili širih oscilacija usled većeg broja analizovanih pacova, teško je utvrditi. S obzirom na veći broj analiza (u nas analizovan 91 pacov, a u njega svega 38), bilo bi možda moguće da su u našem radu u analize došle i životinje sa većim individualnim odstupanjima. Dok u Sachsa individualne oscilacije iznose $\pm 29\%$, dotle u nas iznose $\pm 66,2\%$, dakle stepen relativne oscilacije oko srednje vrednosti dva puta je veći nego kod Sachsa (jer naš minimum ide niže, a maksimum više od njegovog).

Organske frakcije u našim analizama iskazane su nešto drugačije nego u Sachsa, prvo zato što smo vrednosti za grupu šećernih frakcija sabrali u jednu jedinstvenu cifru, i drugo, jer Sachs nije izneo podatke za sve organske frakcije u jetri, već samo za acidsolubilne. Prema tome, u našim nalazima neke frakcije nisu iskazane kao samostalne vrednosti (glikogenska, Cori-estar, itd.: triozofosfata), dok u Sachsa jesu. S druge strane, neke se frakcije kod nas nalaze u višku. Sastavljanje rezultata šećernih frakcija u zajedničku vrednost izvršili smo, jer trenutno kao pojedinačne frakcije nemaju neposrednog značaja za našu problematiku, pošto se u njima promene vrše, ne seobom fosforne kiseline, već transformacijom organskih radikala, ili premeštanjem fosforne kiseline unutar istog radikala. Za razliku od Sachsovih, naše analize obuhvatile su fosfolipoide i nukleoproteide, jer i ove frakcije nastaju u jetri spajanjem odgovarajućih radikala sa fosforom kiselinom. Ako uporedimo samo one organske frakcije, koje su zajedničke u našoj i u Sachsovoj analizi, možemo ustanoviti da su prosečne količine naših organskih frakcija znatno manje od njegovih, tako da neslaganja naših sa Sachsovim rezultatima stoje u obrnutoj proporciji; dok je kod nas neorganska vrednost za oko 31% veća od njegove, dotle su njegove organske frakcije znatno veće od naših. To se najlepše može uočiti u tabeli u kojoj su uporedo prikazani Sachsovi i naši rezultati (vidi tablicu br. 5). Ako naše i Sachsove apsolutne vrednosti preračunamo u procentne veličine, tako da neorgansku frakciju uzmemo kao bazu za ekvivalenciju, tj. da našu i Sachsovu neorgansku frakciju označimo kao 100%, vidimo da razlike ostaju i dalje upadljive. Razlog za postojanje ovako upadljivih razlika u suprotnim smerovima ne možemo naći ni u našim niti u njegovim analizama neaktivnog fosfora.

Osim sa Sachsovim, naše smo rezultate uporedili i sa nalazima drugih autora, ali nažalost postoji vrlo malo kompletnih radova u tom smeru. Hevesy daje (10) za neorganski fosfor u jetri pacova vrednosti od 19,4 do 30,6 te mu je srednja vrednost bliska našoj. Oscilacije oko srednje vrednosti kod Hevesyja iznose nešto preko $\pm 20\%$. Njegovi podaci za labilni P od ATP-a kod istih pacova kreću se između 5,7 i 22,3 mg⁰/₀. Od srednje aritmetičke vrednosti Hevesyjev labilni P pokazuje oscilacije u opsegu od oko $\pm 57\%$. Zasluga je Hevesyja što je ukazao na uzroke oscilacije. Hevesy je ustanovio napr. da dolazi do opadanja neorganske komponente kada se pacovima daje mnogo šećera sa hranom, dok istovremeno rastu organske. Minimalne vrednosti za neorgansku frakciju (19,4 mg⁰/₀) nalazio je kod pacova koji su imali maksimalne količine organski vezanog fo-

sfora (na pr. 22,3 mg⁰/o labilnog ATP-a). Maksimalni neorganski fosfor (30,6 mg⁰/o) našao je kod životinja hranjenih sa mnogo proteina, gde je ujedno ustanovljena i niska količina organski vezanog fosfora (na pr. 8,6 mg⁰/o labilnog P iz ATP-a) (10).

Prema ovim Hevesyjevim nalazima vezivanje fosfora za organske frakcije bilo bi proporcionalno sa porastom šećera u hrani, a možda i obrnuto proporcionalno sa količinom proteina u hrani (?), a verovatno nezavisno od viška masti u hrani (10).

Možda ne bi bilo bezrazložno na osnovu ovih Hevesyjevih nalaza pomisliti da su naši pacovi sa hranom uzimali malo šećera uz mnogo proteina. Što se tiče tipa hrane, naši su pacovi dobijali mleko AD LIBITUM (tj. u višku, te su jeli koliko su želeli). Doduše i zobi su imali AD LIBITUM, ali moguće bi bilo da su pacovi pretpostavljali mleko zrna-stoj hrani. Pošto u vreme izvođenja eksperimenata nismo imali na raspoloženju Hevesyjeve podatke, nismo ni znali za te činjenice. U budućim eksperimentima moraćemo voditi strogi režim dijeta, uz redovnu registraciju utroška razne vrste hrane.

Ako u našim analizama uporedimo prosečne vrednosti neaktivnog fosfora svake organske frakcije sa neorganskom, vidimo da proporcija šećernog fosfora prema neorganskom (u jetri) približno iznosi = 1:3, dok je proporcija labilnog fosfora u ATP prema neorganskom kao 1:5, odnosno stabilnog fosfora u ATP prema neorganskom približno kao 1:6, 25. Proporcija fosfora u adenilnoj kiselini prema neorganskom oko 1:11. Kod Sachsa proporcije fosfora organskih frakcija prema neorganskom fosforu sasvim su drugačije (vidi tablicu br. 5).

T A B L I C A b r. 5

	Naziv frakcije	Naši rezultati		Nalazi Jacoba Sachsa	
		Neaktivni P ³¹		Neaktivni P ³¹	
		Apsolutne vrednosti u mg%	%	%	Apsolutne vrednosti u mg%
1	2	3	4	5	6
1	Neorganski P	25,69	100,—	100,—	19,2
2	P iz grupe šećera	8,43	32,9	97,—	18,6
3	Labilni P iz ATP	5,55	20,5	86,5	16,6
4	Stabilni P iz ATP	4,34	16,1	34,4	6,6
5	P iz adenilne kiseline	2,43	9,4	21,3	4,1
6	P iz kofermenta	2,64	10,3	13,5	2,6
7	P iz nukleoproteida	83,5	320,—		
8	P iz fosfolipoida	94,81	356,—		

Količine neaktivnog fosfora iz nukleoproteida i fosfolipoida u našim eksperimentima (Sachs ne daje podatke za ove materije) dva do tri puta premašuju vrednost neorganskog fosfora u jetri. Pošto Hevesy, kao ni Sachs, ne daje kompletne podatke o raspodeli neaktivnog fosfora među sve jetrine frakcije, teško je uporediti naše nalaze sa njihovim podacima, pa ni sa drugima iz literature. Jedini uporedivi podatak za ove dve frakcije našli smo u monografiji H. Bernarda i Gajdosa (2), gde se citiraju analize Javilliera i Allairea (11). Prema ovim podacima ukupna količina P^{31} u jetri pacova (na 100 g svežeg tkiva) iznosi 289 mg. Pri tome na fosfolipoide od toga otpada oko 114 mg^{0/0} a na nukleoproteide oko 53 mg^{0/0} fosfora. U poređenju sa ovim podacima, naši bi nalazi za ukupni fosfor jetre (prosečno oko 228 mg^{0/0}) bili niži od nalaza pomenutih autora. Međutim, kada uporedimo naše rezultate iz pojedinih eksperimentalnih serija i grupa, nalazimo da u naših pet grupa ukupni fosfor jetre iznosi više od njihovog proseka, dok je u tri grupe samo neznatno niži od njihove vrednosti. U ostalim grupama pacova naše vrednosti znatno su niže od njihovih. Za fosfolipoide jetre pacova naši su rezultati niži od nalaza tih autora (94,8 mg^{0/0} namesto njihovih 114 mg.) dok su za nukleoproteide viši (83,5 mg^{0/0} namesto njihovih 53 mg^{0/0}).

Ukupni acidoslubilni fosfor iz naših analiza znatno je niži od odgovarajućih vrednosti kod J. Sachsa i G. Hevesyja (16, 10). Količina fosfora u lipoidima i nukleoproteidima ostaje (prema radovima Mayera i Schaefera) konstantna mada se u njima pojedine komponente neprekidno obnavljaju (13).

Iz gornjih izlaganja se vidi da se naši srednji rezultati, dobiveni analizom običnog neaktivnog fosfora P^{31} , ne poklapaju potpuno sa svim nalazima u literaturi. Oni su ipak bliski nalazima Hevesyja, kod koga je opseg oscilacije tako velik da u sebi obuhvata i nalaze J. Sachsa i naše, dajući uz to i objašnjenja za postojanje razlika.

D) — ODNOS IZMEĐU RASPODELE RADIOFOSFORA I RASPODELE OBIČNOG NEAKTIVNOG FOSFORA U ORGANSKIM SPOJEVIMA JETRE PACOVA

Dok smo u tablici br. 6 vrednosti za neaktivnu komponentu fosfora u raznim jetrinim frakcijama iz naših analiza uporedili samo sa nalazima J. Sachsa, dotle ćemo u sledećoj tablici naše rezultate za radioaktivnu komponentu P^{32} uporediti i sa našim sopstvenim vrednostima za obični neradioaktivni fosfor P^{31} . Za upoređivanje količine neaktivnog fosfora P^{31} bilo bi moguće koristiti kako apsolutne iznose izmerenih količina ove komponente (iz 100 g sveže pacovske jetre), tako i njihove procentne iznose. Naprotiv, nemoguće je za radiofosfor jednostavno upoređivati apsolutne veličine radioaktivnosti frakcija iz 100 g sveže jetre, jer su u sukcesivnim intervalima duž vremenske osovine veoma različite (vidi ranija poglavlja). Stoga smo čak i za međusobno upoređivanje raspodele samog radiofosfora među razne frakcije jetre u uzastopnim vremenskim intervalima, bili prisiljeni da koristimo isključivo procentne veličine. Upoređivanje radioaktivnog sa neaktivnim fosforom moguće je jedino na bazi procentnih vrednosti. U ranijem tekstu već je pokazano da je raspodela radiofosfora u grupi acidsolubilnih frakcija uravnotežena već posle četvrtog sata (računajući od trenutka unošenja u organizam),

dok se ravnoteža raspodele u frakciji fosfolipoida i nukleoproteida postiže znatno kasnije. Da bismo izvršili upoređenja između radioaktivnog i običnog fosfora, morali smo, prema tome, i sve količine neaktivnog fosfora frakcije preračunati u procentne po istome kriterijumu po kome je to već učinjeno za radiofosfor, tj. i za neaktivni fosfor kao 100% uzeta je količina neorganske frakcije.

Kada pak procentne veličine radioaktiviteta u frakcijama uporedimo sa procentnim količinama neaktivnog fosfora u njima, u obe vrste fosfora nalazimo veoma bliske vrednosti procentnih veličina za iste frakcije, mada su sama merenja vršena putem dva sasvim različita i tehnički nezavisna metoda rada. Kada se za obe vrste fosfora (za radioaktivni kao i za neradioaktivni) neorganska frakcija uzme kao osnova za 100%, tada šećerni fosfor u obe komponente čini oko 32% neorganske frakcije (razlika je 0,7). Labilni fosfor iz ATP u obe komponente kreće se između 20 i 22% (razlika = 2,2%). Najveća razlika između radioaktivne i neradioaktivne komponente u grupi acidsolubilnih frakcija nađena je u stabilnom fosforu iz ATP-a (razlika = 5,5%). U fosforu iz adenilne kiseline (razlika = 1,5%) nađena je manja, a u fosforu iz kofermenata veća razlika (razlika = 3,1%) nego u labilnom fosforu iz ATP-a. Mada su razlike između radioaktivne i neradioaktivne komponente fosfora iz fosfolipoida i nukleoproteida znatno veće od razlika u grupi acidsolubilnih frakcija, ipak su i one još u granicama fizioloških kolebanja, odnosno unutar analitičkih razlika nađenih pri merenju kod raznih eksperimentalnih grupa i serija (razlike između P^{32} i P^{31} = oko 18%). S obzirom na jedino moguću tehniku rada (za svaki vremenski interval rađeno na drugoj grupi životinja), možemo smatrati da su procentne količine dveju vrsta fosfora u nukleoproteidima i fosfolipoidima međusobno dovoljno bliske da bi se u daljem izlaganju mogle tretirati kao vrednosti istoga reda.

Činjenica da se primenom sasvim različitih metoda merenja (a pod inače teškim eksperimentalnim uslovima, jer je svaki vremenski interval ispitivan na drugoj grupi životinja) dobijaju vrlo podudarni rezultati za dve vrste fosfora, dozvoljava zaključak da postoji paralelnost između veličine prometa radiofosfora i običnog (neaktivnog) fosfora u jetri pacova. Dok se za radiofosfor (merenjem njegove radioaktivnosti u sukcesivnim vremenskim intervalima) može pratiti brzina njegovog ugrađivanja u organske frakcije jetre, kao i brzina izlaženja iz tih frakcija, dotle je to za obični — neaktivni fosfor veoma teško. Uporednost prometa obeju vrsta fosfora postiže se počev od trenutka kada se u svim frakcijama u jetri dostigne isti stepen specifične aktivnosti za njihov fosfor. Mi doduše nismo smatrali za potrebno da svaki put izračunavamo veličine specifične aktivnosti fosfora iz svake frakcije i u svakom intervalu, pošto nam to i nije bio eksperimentalni zadatak. Ipak, već je tablica br. 3/B pokazala da jednaka specifična aktivnost biva postignuta u svim frakcijama jetrinog fosfora u trenutku kada se proporcije raspodele radiofosfora među njima izjednače i pored razlika u veličinama aposlutnih aktiviteta fosfora frakcije u sukcesivnim vremenima. Posle dostignute ravnoteže, proporcije radioaktivnosti se zatim održavaju oko izvesne srednje veličine tokom čitavog eksperimenta, nezavisno od neprekidnog smanjivanja apsolutne veličine radioaktivnosti u frakcijama, i u čitavoj jetri. Prema tome, proučavanje radioaktivnosti fosfora u jetrinim frakcijama daje nam podatke koji doprinose lakšem uočavanju dinamike sin-

teza i razlaganja tih frakcija. Sagledavanje tih činjenica je osobito olakšano kada se uporede proporcije raspodele neaktivnog fosfora sa proporcijama radiofosfora među frakcijama pre uspostavljene i nakon postignute ravnoteže između sinteza i razlaganja frakcija. Ovo će nam sa svoje strane možda omogućiti da sa više izgleda na uspeh pokušamo prodreti u problem reakcionog poretka kojim radiofosfor protiče kroz sistem organskih jedinjenja u jetri pacova.

Podudarnost među raspodelama dveju vrsta fosfornih izotopa u jetri pacova dala nam je potstrek da pokušamo tražiti da li postoji slična podudarnost i sa nalazima drugih autora u pogledu raspodele fosfora u jetrinim frakcijama (kod pacova). Nažalost, izuzev podataka od J. Sachsa,

TABLICA br. 6

	Naziv frakcije	Nalazi Jacoba Sachsa		Naši rezultati		
		% izračunat prema količini neorganskog P	3 × smanjeni procenti organskih frakcija	Neaktivni P ³¹ u %	Radioaktivni P ³² u %	Srednje vrednosti % između P ³¹ i P ³² iz naših analiza
1	2	3	4	5	6	7
1	Neorganski P	100,—	—	100,—	100,—	100,—
2	P iz grupe šećer. fr.	97,—	32,4	32,9	32,2	32,55
3	Labilni P iz ATP-a	86,5	28,8	20,5	22,7	21,6
4	Stabilni P iz ATP-a	34,4	11,4	16,1	10,6	13,35
5	P iz adenilne kisel.	21,3	7,1	9,4	7,9	8,65
6	P iz kofermenta	13,5	4,5	10,3	7,2	8,75
7	P iz nukleoproteida			320,—	249,5	288,25
8	P iz fosfolipoida			356,—	305,7	330,—

druge kompletne analize ni o neaktivnom niti o radioaktivnom fosforu u frakcijama pacovske jetre nisu nam stajala na raspoloženju. Za Sachsove rezultate već smo ukazali da se veoma razlikuju od naših nalaza (vidi tablicu br. 6) kako u apsolutnim, tako i u procentnim iznosima.

Međutim, Hevesyjeva tvrdnja da se količina ugrađivanja fosfora u neorganske frakcije jetre povećava kod ishrane pacova obilnim količinama šećera dala nam je ideju da bi upoređivanje naših i Sachsovih rezultata možda trebalo postaviti na adekvatniju osnovu. Naime, umesto da nam kao osnova za upoređivanje služi samo neorganska sirovina fosfora, uzeli smo pored toga kao osnovu ekvivalentnosti još i količinu fosfora u grupi šećera: trebalo je videti kako će se ponašati procenti ostalih organskih frakcija kada izjednačimo procentne veličine za šećernu grupu. Odmah se pokazalo da je u Sachsovim nalazima šećerni

fosfor oko 3 puta veći od našeg (i apsolutno i procentno). Stoga smo sve procentne vrednosti za Sachsove nalaze iz tablice br. 5 (izuzev neorganske frakcije) podelili sa brojem 3, te smo za organske acidsolubilne frakcije dobili nove cifre, koje su izložene u koloni 4 tablice 6. Radi boljeg pregleda u krajnjoj levoj koloni — 3 — prenete su i prvobitne procentne veličine iz Sachsove tablice, gde je procenat sračunat neposredno prema neorganskoj frakciji kao 100%-oj. Kolona 4 pokazuje da je relativna raspodela količina — neaktivnog fosfora u grupi acidsolubilnih organskih frakcija u jetri pacova veoma bliska obema našim raspodelama (kada se šećerni fosfor u našim i Sachsovim nalazima uzme kao jednaka procentna vrednost). Zanimljivo je da se naši procenti za radioaktivni fosfor bolje slažu sa Sachsovim procentima za neaktivni fosfor nego sa našim sopstvenim procentima za neaktivnu vrstu fosfora. Neslaganje između naših i Sachsovih vrednosti za labilni fosfor u ATP-u očigledno dolazi od tehničke greške koja je nastala u našim i Sachsovim analizama. U našim analizama radioaktivnosti ove frakcije postoji neproporcionalno visoki labilni fosfor u odnosu na stabilni: labilni je za 2,14 puta veći od stabilnog, što je principijelno nemoguće, jer u ATP-u pored jednog ekvivalenta stabilnog fosfora može biti vezano maksimalno još dva ekvivalenta labilnog fosfora. Prema tome višak od 0,14 u labilnoj frakciji očigledno je greška u analizi. Slično je i u Sachsovim analizama, jer je kod njega proporcija nadmašena čak za 0,62 (tj. stabilna prema labilnoj frakciji odnosi se kao 1:2,62), što je principijelno nemoguće. U labilnom fosforu naše neaktivne komponente naprotiv proporcija je niža od maksimalne, tj. stabilni P odnosi se prema labilnom P kao 1:1,27, što je moguće, jer je vrednost za labilni P ispod granica maksimalnog zasićenja labilnog P-a u ATP-u. Međutim, ako iz naših dvaju rezultata (radioaktivnog i običnog P) uzmemo srednju vrednost, bićemo u granicama teorijske proporcije ovih dvaju frakcija. Prema tome, moraćemo i Sachsovu proporciju dovesti u sklad sa teorijskom proporcijom labilnog i stabilnog fosfora. U tom slučaju Sachsov redukovani procenat (tj. kod izjednačenih vrednosti za šećere) za stabilnu frakciju pokazuje idealno poklapanje sa našim radioaktivnim fosforom za tu frakciju, odnosno neznatno se razlikuje od naše srednje vrednosti dobivene iz dveju vrsta fosfora. Izuzev u frakciji kofermenata, Sachsove vrednosti se bolje slažu sa našim radioaktivnim procentima od naših sopstvenih rezultata za neaktivni fosfor. Dakle, ne samo u obe naše, već i u Sachsovoj analizi postoji slična proporcija procentne raspodele fosfora unutar organskih frakcija acidsolubilne grupe, nezavisno od sasvim različitih apsolutnih veličina tih frakcija. Istovremeno se u tablici br. 5 vidi da naša i Sachsova organska grupa (sa istom proporcijom raspodele fosfora unutar raznih organskih frakcija) ne pokazuju iste proporcije »vizavi« svojih neorganskih frakcija. Obe vrste našeg fosfora iz organskih frakcija slažu se podjednako sa svojom vrstom neorganskog fosfora.

Ova nova podudarnost između proporcija raspodele fosfora u našim i Sachsovim analizama organskog fosfora u jetri pacova veoma nas je impresionirala, jer je ustanovljena na Sachsovom materijalu, koji na prvi pogled tako upadljivo odstupa od naših vrednosti u apsolutnim veličinama. Gornje otkriće je utoliko značajnije, jer pokazuje da organske frakcije u jetri pacova reaguju sa neorganskim fosforom jetre kao jedinstveni sistem, tj. kao celovita grupa. To znači da ni porast niti smanjenje u ma

kojoj organskoj frakciji ne može nastupiti nezavisno od ostalih frakcija ovog jedinstvenog sistema. Neočekivani rezultat daje nov osnov da se, iz još jedne perspektive pokuša objasniti Hevesyjeva tvrdnja, jer nagoveštava zašto ukupna količina fosfora u jetrinim organskim frakcijama zavisi od količine šećera u hrani.

Ovaj nalaz pored toga nagoveštava još i nešto drugo: da među organskim frakcijama u jetri verovatno postoji određeni reakcioni poredak prenošenja fosfora. Pri tom izgleda da šećerna frakcija stoji na čelu odgovarajućeg prenosilačkog niza, dirigujući verovatno dinamiku prenošenja fosfora preko ostalih članova toga niza. Dakle, šećerna grupa morala bi igrati u neku ruku ulogu bilo DONATORA bilo energetskog AKTIVATORA fosfora za prenošenje na ostale članove niza. Moguće je da je šećer putem svoga intermedijernog metabolizma jedini sposoban za direktno vezivanje ili aktivisanje fosfora, dok to možda ne bi mogli činiti (?) ostali članovi toga niza. Ovu ideju trebalo bi svakako još proveravati kako sa teoretskog stanovišta, tako i pomoću novih eksperimenata na jetri pacova.

Iz dosad izloženih činjenica nužno sledi zaključak da organski spojevi jetre reaguju kao jedinstvena grupa sa njenim neorganskim fosforom. Dalje se može reći da je veoma verovatno da šećer stoji na čelu reakcionog niza koji prenosi fosfor. Međutim, izvan toga vrlo je malo činjenica poznato da bi se priroda i stepenice toga prenošenja mogle iz samog eksperimentalnog materijala neposredno objasniti. Stoga se kao prvi zadatak postavlja pitanje pronalaženja redosleda prenošenja fosfora u sistemu organskih jedinjenja u jetri, čime bi se stvorila osnova za ustanovljavanje reakcionog poretka toga sistema.

Jedan od koautora ove publikacije najpre je u drugom delu ovog rada prikazao metode i rezultate izračunavanja transporta, korišćenjem triju vrsta izvornih činjenica (porast radioaktiviteta u periodu njegovog uspona, vreme obnavljanja frakcija, jednačina Guldberg—Waagea). Zatim je, putem primene jednačina (koje je isti koautor u jednom ranijem saopštenju predložio vidi bibliografiju, br. 17) za izračunavanje specifične brzine sinteze i specifične brzine razlaganja, iz veličine transporta i koncentracije frakcija ustanovio konkretne veličine za specifične brzine (sintezе i razlaganja) u svim frakcijama.

Isti je koautor u trećem delu ove publikacije iz veličina transporta i reakcionih brzina najpre formulisao kriterijume koji su mu poslužili za rekonstrukciju reakcionog poretka frakcija ispitanih u ovom radu. Zatim je izvršio i samu rekonstrukciju. I kriterijumi i reakcioni poredak, koji proizlazi iz tih kriterijuma, grafički su prikazani u 2. poglavlju III dela. U trećem poglavlju autor je na primerima koncentracija i transporta frakcija iz ove publikacije, pokazao kakvi odnosi nastaju u reakcionom lancu ireverzibilnih procesa metabolizma između tih dveju vrsta veličina.

(Fiziološki institut Medicinskog fakulteta u Sarajevu)

A. SABOVLJEV, A. BEČAREVIĆ, L. MICKOVIĆ & A. FAJGELJ, EXAMINATION OF PHOSPHORUS METABOLISM IN LIVER OF RATS BY RADIOPHOSPHORUS

SUMMARY

In the first (experimental) part of the paper, at the beginning, data are presented on the rate of excretion in 16 rats over a period of 18 days. The data are based on test for and measurements of radioactivity in 260 excreta of urine and feces respectively. The particular object of this measurements was to determine the balance of radiophosphorus exchange. Since each of the excreta of feces and urine was measured three times, the total number of measurements of radioactivity in excrements on rats was 1,560.

In a group of 87 rats the radioactivity of inorganic phosphorus in the liver was measured three times in each case, so the total number of measurements of activity in the inorganic fraction of the liver was 261.

The measuring of radioactivity in the blood of 20 rats was done 60 times.

Finally, the radioactivity was measured in twelve different organic fractions of the liver involving a group of 87 rats. Since in these cases each fraction was also measured three times, the total number of measured fractions was 3,132. If the above totals of the measurement of radioactivity in different components and samples obtained from the rats are all added up, the grand total amounts to 5,013, i. e. the number of measurements of radioactivity taken in experiments on rats.

A chemical quantitative analysis was also done in livers of the same group of rats, concerning the content of ordinary (not radioactive) phosphorus in organic and inorganic fractions. All together, the number of colorimetric measurements of ordinary phosphorus was 3,393.

The results of these measurements formed the basis of experimental studies concerned with four different problems: 1) the balance of the turnover of radiophosphorus, 2) the distribution of radiophosphorus in several functional systems of the organism of rats, 3) the movement and distribution of radiophosphorus over the organic fractions — considered as a function of time — in the liver of rats, and 4) the distribution of ordinary phosphorus in liver fractions of rats.

1) The study of the radiophosphorus balance came first. The animals were each administered a dose of 10 microcuries of radiophosphorus in the stomach by means of a rubber tube. One 1,000 th part of the dose was kept, each time, as a standard gauge for the testing of momentary radioactivity by a Geiger counter (phosphorus standard gauge). This reference sample was kept until the end of the experiment, its activity being re-measured at certain fixed intervals. Every twenty-four hours the total quantities of the excreted radiophosphorus in the daily excreta were measured over a period of thirty-six days. During the first few days the measurement was concerned with a larger number of rats but the number of animals to be measured for radioactivity of the excreta gradually decreased (because one group after another had in turns to be sacrificed at fixed periods so that fractions of their livers could be used for an analysis of the content of radioactive and non-radioactive phosphorus). During the final days of the experiments the excrements on only four of the animals were collected, whereas in the first few days as many as 16 animals had been used for the purpose. The results established the fact

that the excretion rate was approximately 10 per cent in the course of the initial twenty-four hours; during the 2nd and 3rd days the rate was over 5 and 3 per cent respectively; then the rate of excretion gradually decreased to about 1 per cent. Around this intensity the radioactivity remained stationary for a longer period, at the same time continuing to decline steadily, though at a much slower rate than over the first few days. While the first 10 per cent became excreted during the first twenty-four hours, the following 10 per cent did so over the successive 3 days. It took another sixteen days before a third of the originally introduced dose was excreted. The excretion of one half of the amount of introduced radiophosphorus took over 50 days. The results of the experiments go to show that radiophosphorus stays in the organism for a long time, which as a rule allows of an effective tracing of its exchange in the organism.

2) The second set of problems studied in the experimental part was concerned with the distribution of inorganic radiophosphorus in particular functional systems of the organism of rats. The main object of the analysis was to establish what part of the retained phosphorus remains in the liver, or what the conditions are that affect the content of radiophosphorus in the liver during the experimental period, for the main theme of our paper is concerned with the exchange (the turnover) of radiophosphorus in the liver. Therefore, concurrently with estimations of radioactivity in the excrements, we also measured radioactivity in the blood, respectively in the liver itself. The measurement concerning the liver was done in all the series of experiment (all together four series of rats were used consisting of 20 to 24 animals each) while the radioactivity in the excrements was measured in the first series only, and that of the blood in the second.

Comparative measurements of radioactivity in blood, liver and excreta have shown that a constant rate of distribution of radioactivity soon establishes itself between blood, liver and excreta, which is maintained independently of continual changes in absolute rates of radioactivity in the systems concerned. Unavoidable technical errors apart (and possibly also the corresponding difference in the general speed of the process of metabolism in particular groups of rats), we can say that the experiments have abundantly demonstrated that in all blood (i. e. in a mass of 20 gr.) of one rat the radioactivity is maintained in the approximate proportion of from 1:1 to 1:1,3 in relation to the whole of the liver, while the radioactivity in all blood and the excreta is in the ratio of 1:7 — 1:10. These ratios are also borne out by the fact that the curve of decrease in radioactivity is very nearly identical in all three systems. Taking it all together, the absolute rate of radioactivity tends to decrease rapidly in all three systems, and the coefficient of radioactivity decrease in the blood during the 4 to 24-hour period is approximately 5,8:1, and in the liver during the 2 to 24-hour period it is 6,22:1, or 4,5:1 during 4 — 24 hours.

This group of experiments and the data obtained go to show — from the viewpoint of radiophosphorus distribution over the examined 3 functional areas — that the organism of rats behaves as a uniform (unione) reactive medium which, in a comparatively short time, establishes the balance of radiophosphorus distribution over the areas, retaining the same proportions until the end of experimental period. Accordingly the process of radiophosphorus exchange goes on in a correlative manner, the changes in one of the systems being made adequately manifest in the others.

3) The third and main set of problems dealt with in the paper was concerned with a study of the metabolism of radiophosphorus in the liver of rats and the rate of its distribution, considered as a function of time, in the organic compounds of the liver. This series of experiments was made upon a group of 87 rats. In aether narcosis, the livers were in each case taken out and placed without delay in liquid air. Extractions were then made in three stages, namely a) the excretion of acid-soluble fractions of phosphorus by J. Sachs's method, b) the excretion of lipoid fractions by the partly modified G. Hevesy test, and c) finally, the residual phosphorus which had been bound in the nucleoprotein fraction was obtained from the remainder of the liver tissue. Liberation of this phosphorus from the tissue was done by the method of Kjeldahl in the first two series, and in the last two an electric cradle was used.

Separate acid-soluble fractions were then detached (from the general acid-soluble extract) by the J. Sachs method. The phosphorus was finally liberated from these fractions by the technique used according to the directions of the method. From phospholipids the phosphorus was liberated by the same procedure as in the case of nucleoproteins (i. e. by the Kjeldahl method in the first 2 series, and by the use of the electric cradle in the last two). After being liberated from their organic connectives, all the phosphates (of organic as well as inorganic origin) were then left to settle in order to form a sediment as ammonium phosphomolybdates; they were used for the purpose of measuring the quantities of analytical (the ordinary, not radioactive) phosphorus contained in particular fractions, as well as for the counting of beta radiation of the radiophosphorus, which was always found intermixed and combined with the compounds of ordinary phosphorus. Non-active analytical phosphorus was determined by the quantitative-colorimetric method after Benedict. Beta rays were estimated by the use of the Geiger counter produced at the »Boris Kidrič« Institute for Nuclear Studies at Vinča. Colorimetric analyses were gauged by the Pulfrich photometer with S-69 filter in the experiments concerned with the first 2 series, while all subsequent measurement was done by the use of Beckmann's spectrophotometer, model DU, by means of light and the wavelength of 750 millimicrons. The following were the fractions isolated from the liver: the inorganic, all sugar fractions (glycogen, glucose, and all intermediary products of its decomposition), the fraction of labile and stable phosphorus from ATP, adenilic acid and a fraction of coenzymes (viz. all acid-soluble fractions). The phospholipid fraction was not subdivided but analysed only as a whole, was also done in respect of the nucleoproteins.

The results of these analyses showed that motion of radioactivity of the organic fractions runs parallel to that of the inorganic ones, but only partly so, for the respective curves of radioactivity are different. The parallelism to inorganic phosphorus is shown by the sugar group and the labile as well as the stable fractions from ATP. The adenilic acid and coenzymes differ from all the acid-soluble fractions in that they are slow to reach the maximum of radioactivity of the phosphorus contained in the fractions, and also because of the slower rate of decrease in activity following the maximum. The greatest divergences from the inorganic fractions were found in the phospholipid and the nucleoprotein fractions, for they are the latest to reach the maximum while exceeding by far the activity-rate of the other fractions during the period of the decline of radioactivity. The comparisons of radioactivity between the liver fractions were made in accordance to two criteria. The first to be

compared were the absolute rates of radioactivity, and then the ratios of radiophosphorus distribution in the organic liver fractions were compared at particular successive intervals. It was shown that already after a two-hour interval (the time when the first rats were sacrificed) the distribution over the fractions having a motion of radioactivity parallel to that of the inorganic fraction proceeds in the same proportions as those of later periods. On the other hand, as regards the coenzymes and the adenilic acid the constancy of the rate of phosphorus distribution is realised only after an interval of two hours, that is to say, in the case of the adenilic and the coenzymes after 3 and 4.4 respectively. As regards the phospholipoids, the constant rate of radiophosphorus distribution is realised after 22.8 hours, while the nucleoproteids, the slowest of all, take as much as 30.7 hours. The constancy of the rates of radiophosphorus distribution goes to show by itself that the same specific phosphorus activity comes to be established in all liver fractions; however, this can only be determined directly on the basis of comparisons with the results of a quantitative analysis of ordinary (not radioactive) phosphorus.

4) The fourth series of analyses was concerned with the determination of quantities of ordinary phosphorus in the above liver fractions. The results of the analyses are shown in tabular form. As regards the conclusion, a special mention deserves the fact that the proportions of the ordinary phosphorus distribution in the liver fractions fully correspond with the proportions of their radioactivity. This fact only confirms the conclusion that follows from the constancy of percentual distribution of radioactivity after an interval of 30.7 hours. This shows that after the balance of distribution of radioactivity has been reached the specific phosphorus activity of all fractions actually becomes identical with the specific activity of inorganic fractions of the liver in a given time. The proportions of radioactivity for all time-periods after 30.7 hours being equal to the proportions of the ordinary (not radioactive) phosphorus, the specific activity of organic fractions cannot but decline corresponding to the decrease of specific activity of the inorganic fraction.

In comparing our results of the experiments relative to the ordinary non-active phosphorus with the findings of other authors in the field, we find that the averages of our organic phosphorus are lower and those of the inorganic phosphorus higher than those reported by, among others, J. Sachs, the increase in the percentage being approximately 30.0 and the decrease about 65.0 with reference to inorganic phosphorus and that of organic fractions respectively, as the result of experiments upon our rats and those of Sachs. The difference might be accounted for by the fact (established by Hevesy) that rats when given food rich in sugar tend to increase the organic and to decrease the inorganic fractions of the liver phosphorus. Hevesy's experimental rats who were given food containing large amounts of sugar showed a rats of phosphorus distribution in their liver fractions similar to that of Sachs's rats, whereas the rats with large amounts of protein and without sugar in their food showed a phosphorus-distribution rate similar to the one found in our animals.

Since it is sugar, as suggested by Hevesy, that determines the dynamics of the building-up of organic phosphorus compounds in the liver of rats, we decided to re-examine and compare once more our findings with those of Sachs on the basis of equivalency of saccharine phosphorus. We were much impressed on finding very similar proportions of phosphorus distribution within the organic group fractions by the side of totally different proportions of the whole group of organic fractions of our rats and those of Sachs, as

compared with the corresponding quantities of their inorganic phosphorus. It was this fact that suggested the idea of organic, as against the inorganic, liver fractions reacting as a uniform reactive system. The question soon arose whether it was possible to learn — from our experimental facts and data — the nature of the order of organic substances, that brings about this uniform reaction. Since the experimental facts failed to provide a direct answer, it became necessary to discover a method that should make such an attempt practicable. The method which suggested itself consisted in the application of Guldberg-Waage's law of the action of active masses upon the metabolism of phosphorus in the liver of rats. Since the experiments had pointed to the possibility of the reactive unity being brought about by the irreversible chain of metabolism, one of the co-authors of this paper first expounded the theory of the possibility in question (16), and in the second and third parts of this paper the same co-author applied the methods derived from his theoretical studies to the results of these experiments.

(The Institute of Physiology of the Faculty of Medicine,
Sarajevo University)

L I T E R A T U R A

1. Benedict, S. R. and Theis, R., — *Journ. Biol. Chem.*, — LXI, — 63, — (1924).
2. Bernard, H. et Cajdos, A., — *Les fonctions hépatiques*, — Paris, — (1952).
3. Bentalamffy, L., — *Theoretische Biologie*, — II bd., — Bern, — (1950).
4. Borsook, H., — *Biol. Rev.*, — 11, — 147, — (1936).
5. Brachet, J., — *Embriologie chimique*, — Paris, — (1949).
6. Chagraff, E. and Keston, A. S., — *J. Biol. Chem.*, — 134, — 515, — (1940).
7. Cohn, W. E. and Greenberg, D. M., — *J. Biol. Chem.*, — 123, — 185, — (1938).
8. De Groot, S. R., — *Thermodynamics of irreversible processes*, — Amsterdam, (1952).
9. Gaunt, W. E., Griffith, H. D. and Irving, J. T., — *J., Physiol.*, — 100, — 372, — (1941/2).
10. Hevesy, G., — *Radioactive indicators*, — New York-London, — (1948).
11. Javillier, M. et Allaire, H., — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, — 8, — 924, — (1926).
12. Keighley, G. L. and Borsook, H., — *Proc. Roy. Soc.*, — B — 119, — 488, — (1935).
13. Mayer, A. et Schaeffer, G., — *Journ. Pysiol. path. gén.*, — 15, — 773, — (1913).
14. Prigogine, I., — *Étude thermodynamique des processus irréversibles*, — Paris — Liège, — (1947).
15. Richet, C., — *Arch. physiol. norm. et path.*, — 26, — 232, — (1894).
16. Sachs, J., — *J. Biol. Chem.*, — 182/2, — 655, — (1949).
17. Sabovljev, A., — *ACTA Naučnog društva NR Bosne i Hercegovine*, — Medic, — VIII/4, — 55, — (1957).
18. Sabovljev, A., — *Ibid.*, — VIII/4, — 79, — (1957).
19. Sabovljev, A. i Perić, B., — *Ibid.*, — I — 179, — (1953).
20. Schoenheimer, R., — *The dynamic state of body constituents*, — Cambridge, — Massachussets, — (1946).
21. Spiegelmann, S., and Kamen, M. D., — *Science*, — 104, — 581, — (1946).
22. Taylor, M. B. and Best, C. H., — *The physiological basis of medical practice*, — Baltimore, — (1945).
23. Tweedy, W. R. and Campbell, W. W., — *J. Biol. Chem.*, — 154, — 339, — (1944).