



Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

## **RADOVI XII, knj. 6.**

**Kovačević, Blagoje**

**1959**

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

<https://bastina.anubih.ba/items/7d75afc9-1a9f-4e73-9085-97acf45a15d5>

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

<https://bastina.anubih.ba/>

NAUČNO DRUŠTVO N. R. BOSNE I HERCEGOVINE

# RADOVI

KNJIGA XII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 6



SARAJEVO  
1959

ALEKSANDAR SABOVLJEV

**POKUŠAJ REKONSTRUKCIJE REAKCIONOG PORETKA METABOLIZMA FOSFORA U JETRI PASOVA IZ EKSPERIMENTALNIH ČINJENICA I DELA I IZ REAKCIONIH KONSTANTI II DELA\*)**

(Primljeno na sednici Odeljenja medicinskih nauka 8-VIII 1958 god.)

**1) Odabiranje i analiza kriterijuma za rekonstrukciju poretka**

U jednoj ranijoj publikaciji (14) autor je teoretski raspravljao o mogućnosti izračunavanja reakcionih konstanti iz podataka transporta i koncentracija frakcija organizovanih u lančasti poredak metabolizma ireverzibilnog karaktera. Ideja za takvu pretpostavku nikla je s jedne strane iz podudarnosti proporcija koncentracija fosfora u organskim frakcijama u jetri pacova naših analiza i analiza J. Sachs-a (13), mada su koncentracije za pojedine frakcije kod nas i kod Sachs-a bile sasvim različite u pogledu njihove apsolutne vrednosti. S druge strane tu ideju je još jače potkrepio nalaz Hevesy-a, da ove apsolutne razlike nastaju pod uticajem različite količine šećera u hrani pacova. Kad smo ustanovili da se iste proporcije ponavljaju i u procentnim veličinama radioaktivnosti istih organskih frakcija, nezavisno od njihovih apsolutnih veličina, stekli smo ubedenje da cela grupa organskih jedinjenja fosfora u jetri reaguje sa neorganskim fosforom kao jedinstvena grupa, tako da porast organski vezanog fosfora može teći samo na račun smanjenja neorganskog fosfora jetre i obratno. Čini nam se da je tim činjenicama već skoro dokazano da šećer mora stajati na čelu takvog reakcionarnog lanca, te da pojedini članovi lanca verovatno jedan drugome određenim redosledom predaju fosforu kiselinu (skraćeno: fosfor).

Međutim ovi dokazi treba još da budu potvrđeni i primenom reakcionih konstanti na metabolizam tih frakcija. Za izračunavanje reakcionih konstanti priredili smo teorijsku bazu već ranije (14) za specifične brzine sinteze i razlaganja, dok smo u II delu ovog rada razradili metodu izračunavanja i ustanovili konkretne veličine transporta iz procentnog porasta radioaktivnosti frakcije u periodu njegovog uspona. Ujedno smo u II delu primenom formula iz pomenute naše publikacije izračunali i specifične brzine za sinteze i za razlaganja za sve frakcije. Međutim, ni jednačina iz naše ranije publikacije pod br. 14, niti re-

---

\*) Ispitivanje metabolizma fosfora u jetri pacova pomoću radiofosfora. III deo.

zultati samih eksperimenata iz I dela ovog rada, kao ni reakcione konstante u široj formi, bez uporedne analize još ne mogu dati informacije o verovatnim reakcionarnom poretku metabolizma forsora u jetri pacova.

Zadatak III dela ove publikacije sastoji se najpre u tome da se sistematizuju svi podaci koji bi mogli služiti kao pokazatelj za otkrivanje činjenica pogodnih da neposredno istaknu raspored ili redosled frakcija u poretku. Naši rezultati imaju tu odliku što su dobiveni iz eksperimenata organizovanih baš na način da principijelno mogu otkriti reakcioni poredak. Potrebno je samo odabrati pokazatelje poretka (u koliko ih je analiza objektivno ustanovila) i sistematizovati ih po njihovim prirodnim svojstvima. U tu svrhu sastavili smo tablicu br. 1, u koju smo uneli podatke o apsolutnom transportu, o transportu iskazanom u procentima obnavljanja frakcije (obe veličine uzete su za jedinicu vremena od 2 h). Zatim su izneta vremena obnavljanja frakcije. U kolonama 5, 6, 7 i 8 obnavljanja za sve frakcije prikazana su iz posebnog aspekta: upoređuju se obnavljanja svih frakcija sa stanovišta frakcije čije je posebno obnavljanje najsporije, pod pretpostavkom da najsporija frakcija odražava ritam obnavljanja celog lanca (čiji nam je poredak za sada inače nepoznat). Kao vremenska baza za upoređenje obnavljanja celog lanca, uzeta je zato frakcija nukleoproteida. U koloni 5 pokazano je da se pojedine frakcije obnavljaju u nejednakim frekvencijama u periodu u kome se nukleoproteidi obnove svega jednom. Najveći broj obnavljanja u periodu od 1845 minuta (vreme obnavljanja nukleoproteida!) doživljuje neorganski fosfor (73,2 puta = 7.320% obnovljene frakcije). Zatim najvešće biva obnovljen fosfor u grupi šećera (47,3 puta = 4.730%) itd. U koloni 6 količina obnavljanja frakcija za period od 1.845 minuta (obnavljanje rukleoproteida!) iskazana je u broju miligrama fosfora za svaku frakciju. Vrednosti su dobivene množenjem frekvence obnavljanja frakcija sa koncentracijom fosfora u frakciji. Maksimalan broj miligrama u transportu iskazan je u neorganskoj frakciji (1880 mg), zatim u grupi šećernih frakcija (395 mg) itd. Najmanji apsolutni transport za vreme trajanja ovakvog ciklusa obnavljanja nukleoproteida nalazimo u kofermentima (19,3 mg). U hemiji je običaj upoređenja vršiti na bazi ekvivalenata, a dobijaju se ako se svi članovi koji reaguju skupa podele sa najmanjom apsolutnom veličinom. Ovde ćemo dakle sve transporte podeliti sa 19,3 (transport kofermenata!). Tako dobivene vrednosti transporta iskazane su u ekvivalentima kofermentske jedinice. Kolona 7 sadrži tačne vrednosti nastale ovom deobom, dok su u koloni 8 te cifre zaokružljene na vrednost najbližeg celog broja. Izuzetno su za adenilnu kiselinu i za stabilni fosfor iz ATP-a uzete srednje vrednosti između dva cela broja. Razlog je bio u tome što je transport adenilne kiseline znatno veći nego u kofermenata, te smo smatrali da ne bi bilo sasvim realno izjednačiti ih na istom nivou. Za stabilni forsor iz ATP-a smo smatrali da će bolje harmonizirati sa adenilnom kiselinom ako i njega iskažemo sa polovinom ekvivalenta. Kada smo to učinili sa stabilnim, onda smo labilni morali dati u proporciji koja je stvarno iskazana u veličinama njihovih transporta. Najzad za šećer smo mogli ići radije na niže, ali smo uzeli višu vrednost, jer smo smatrali da je našim proračunom dat minimum, a ne optimum transporta za tu frakciju, te smo se orijentisali prema onom što smo smatrali realnijim.

Kako ekvivalenti na uprošćeni način prikazuju veličine transporta pojedinih frakcija, time se znatno olakšava postupak za odabiranje kriterijuma o reakcionom poretku frakcija u metabolizmu fosfora u jetri pacova.

U tablicu br. 1 nisu uneti podaci o specifičnim brzinama sinteza i specifičnim brzinama razlaganja, jer su na pregledan način već prikazane u tablici br. 4, II dela ovog rada (18).

Tablica br. 1.

Naziv frakcije	Obnavljanje neaktivnog fosfora tokom prva dva sata		Vreme trajanja ciklusa obnavljanja pojedinih frakcija u minutama	Obnavljanje fosfora unutar vremena najsporijeg ciklusa obnavljanja (1,845 min.)				Koliko je izišlo fosfora iz frakcije u jedinici vremena (2 h) putem razlaganja za prva 2 h
	u mg	u % od C		Koliko se puta obnovi citavi ciklus obnavljanja frakcija u % C	Apsolutna količina obnavljanja fosfora u frakcijama		U ekvivalentima izračunatim iz najmanje frakc.	
					u mg	stvarno		
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Neorganski P	120,—	460,—	25,2	7.320	1.800	97,2	97	120,—
P iz šećernih frakcija	25,4	301,—	39	4.730	395	20,5	21	25,4
Labilni P iz ATP	15,3	279,—	43	4.300	238,—	12,4	13	15,3
Stabilni P iz ATP	7,77	232,—	52	3.550	119,—	6,17	6,5	7,77
P iz adenilne kiseline	1,63	70,5	170	1.085	25,2	1,31	1,5	1,16
P iz kofermenata	1,25	53,0	223	830	19,3	1	1	0,87
P iz nukleoproteida	4,82	6,58	1.845	100	73,3	3,8	4	0,317
P iz fosfolipoida	7,44	8,75	1.369	135	115,—	5,96	6	0,65

Specifične brzine kao i veličine transporta iz tablice br. 1 otkrivaju nam neke karakteristične elemente, koje je potrebno analizom tačno formulirati. Počecemo sa specifičnim brzinama sinteza. Zatim ćemo proučiti specifične brzine razlaganja. Kao kriterijum za analizu uzećemo njihov odnos prema frakciji nukleoproteida (kao frakciji koja određuje trajanja ciklusa obnavljanja fosfora u celom lancu). U analizi nećemo obuhvatiti neorgansku frakciju, jer njena koncentracija stoji u obrnutoj proporciji prema koncentracijama fosfora u organskim frakcijama.

Pada u oči da od organskih frakcija najnižu vrednost za specifičnu brzinu sinteze ima šećerna frakcija, kod koje istovremeno najveći transport fosfora ostvaruje srazmerno nisku koncentraciju svog vezanog fosfora. Ova je činjenica, u dobroj saglasnosti sa poznatim pravilom u reverzibilnim reakcijama zatvorenih sistema gde postizanje ravnoteže pomoću velikih koncentracija ulaznih supstancija uz male koncentracije proizvoda sinteze, ukazuje na malu specifičnu brzinu sinteze. Prema

tome u otvorenom lancu transport vrši principijelno identičnu ulogu u procesu sinteza, koju u zatvorenom sistemu reverzibilnih reakcija inače obavlja koncentracija reagujućih supstancija. S druge strane posedovanje male specifične brzine sinteze može se uzeti kao potvrđan kvalitet za frakciju šećera, tj. da je sposobna stajati na čelu lanca fosfornog metabolizma, pošto su još pre više decenija Pütter i Winterstein (12, 21) kasnije i Jost (6), a u novije vreme i Gurney (3), ustanovili da brzina prenošenja u lancu metabolizma zavisi od brzine njegovog najsporijeg člana. Ako usvojimo zaključak iz Hevesy-evih rezultata (5), da je količina šećera u hrani određujući faktor za količinu organskog vezivanja fosfora u jetri pacova, nužno moramo usvojiti da tu ulogu šećer može ostvariti samo ako se nalazi na čelu lanca. Ako je posedovanje male specifične brzine za sintezu (šećer, labilna i stabilna frakcija APT-a, fosfolipoidi) kriterijum za položaj na čelu lanca, onda je logičan i obrnuti zaključak da frakcije sa velikim specifičnim brzinama sinteza moraju stajati na zadnjem kraju lanca. Prema ovom kriterijumu kofermenti, adenilna kiselina, a verovatno i nukleoproteidi moraju biti pri završetku lanca. Neposredno iza šećera morala bi stajati po ovom kriterijumu labilna frakcija ATP-a, a odmah iza nje došla bi stabilna frakcija ATP-a i fosfolipoidi (upoređi sa grafikonom br. 1).

Da bi sve količine koje služe kao pokazatelji i kriterijumi za određivanje položaja pojedine frakcije u reakcionom poretku metabolizma fosfora u jetri pacova postale neposredne i očigledne, sastavili smo grafikon br. 1. Mada je sastavljen na čisto kvantitativnoj osnovi, ovaj grafikon služi kao izvanredno ubjedljiv argument za kvalitativne zaključke.

Sledeći kriterijum za procenjivanje redosleda frakcija u poretku prenošenja daju veličine specifičnih brzina razlaganja (vidi grafikon br. 1). Dok za sintezu fosfora najmanju specifičnu brzinu ima grupa šećera, ona ujedno ima najveću specifičnu brzinu razlaganja (vidi II deo kolona 3, tablice br. 4). Ova osobina čini grupu šećera naročito pogodnom za funkciju prenošenja, pošto svoj fosfor ne može dugo zadržavati vezanog. Dakle i po ovom kriterijumu šećerna grupa mora stajati na čelu lanca. Specifična brzina razlaganja u labilnoj frakciji ATP-a manja je svega za 8% od specifične brzine razlaganja u šećernoj frakciji. Stabilna frakcija dolazi na treće mesto po veličini specifične brzine razlaganja (za 24% manja nego u grupi šećera). Najmanje specifične brzine razlaganja nalazimo u frakcijama nukleoproteida i fosfolipoida. Kofermenti u tom pogledu zauzimaju srednji položaj. Prema ovome kriterijumu na zadnjem kraju lanca bili bi nukleoproteidi i fosfolipoidi. Potsećamo da fosfolipoidi prema prvom kriterijumu treba da zauzmu mesto negde napred (upoređo sa stabilnim fosforom iz ATP-a), dok je drugi kriterijum protivurečan sa prvim, jer po njemu treba da budu pozadi zajedno sa nukleoproteidima. Nukleoproteidi po prvom kriterijumu treba da budu negde iza sredine lanca, dok ovde vidimo da treba da budu poslednji po redu. Prema kriterijumu sinteza kofermenti i adenilna kiselina došli bi na kraju lanca, dok po kriterijumu razlaganja dolaze više napred, tj. negde po sredini lanca (Pogledaj grafikon br. 1).

Novi kriterijum za određivanje redosleda u lancu prenošenja fosfora nalazi se u podacima o procentnom obnavljanju fosfora u pojedinim frakcijama u jedinici vremena. Kolona 3 tablice br. 1 obnavljanje fosfora iskazuje u procentima njegove koncentracije. Vidi se da u ovoj koloni frakcija šećera sa 304% obnavljanja koncentracije stoji na čelu celog lanca. Odmah iza šećera dolazi labilna frakcija fosfora u ATP-u, sa 279% obnavljanja frakcije, a za njom dolazi stabilna frakcija sa 232% obnavljanja. Najmanje procenete obnavljanja fosfora u frakciji pokazuju nukleoproteidi i fosfolipoidi. I prema ovom kriterijumu šećeri se nalaze na čelu lanca; za njima slede labilna, a odmah zatim stabilna frakcija ATP-a. Na završetku lanca nalaze se (po ovom kriterijumu) nukleoproteidi i fosfolipoidi. Kofermenti i adenilna kiselina nalaze se u sredini lanca, iza labilne i stabilne frakcije ATP-a (Vidi grafikon br. 1).

I apsolutna količina unošenja fosfora u strukturu frakcije tokom prva dva sata (posle davanja radiofosfora pacovima) daje određeni kriterijum za formiranje pretstave o poretku prenošenja fosfora. Tako na pr. frakcija šećera koja sadrži 8,36 mg stacionarnog fosfora, primi tokom prva dva sata novih 25,4 mg fosfora. Za to vreme labilni fosfor na svoju stacionarnu koncentraciju od 5,53 mg primi još 15,3 mg novog fosfora, dok stabilni fosfor svoju koncentraciju od 3,36 mg obnovi sa 7,77 mg novog fosfora. Skoro sa istom apsolutnom količinom kao i stabilni fosfor iz ATP-a (tj. sa 7,44 mg) obnavljaju fosfolipoidi svoju veliku stacionarnu koncentraciju od 85 mg. Prema apsolutnoj količini unošenja novog fosfora u frakciju, fosfolipoidi stoje skoro uporedo sa stabilnom frakcijom iz ATP-a. Iza stabilne frakcije i fosfolipoida po ovom kriterijumu nalaze se nukleoproteidi. Najmanje apsolutno obnavljanje pokazuju frakcije kofermenata, dok adenilna kiselina ima nešto veće apsolutno obnavljanje fosfora u svojoj frakciji. I prema ovom kriterijumu šećerna grupa se nalazi na čelu lanca. Na repu lanca se po ovom kriterijumu nalaze kofermenti, a odmah ispred njih adenilna kiselina.

Vreme koje je neophodno da se čitavi fosfor frakcije zameni novo-došlim, takode daje određene kriterije za redosled frakcija (vidi kolonu 4 tablice br. 1). Najkraće vreme potrebno je šećernoj grupi da obnovi čitavu koncentraciju fosfora sadržanog u frakciji (39 minuta). Za obnavljanje ukupne količine labilnog fosfora u frakciji ATP-a potrebno je 43, a za stabilni fosfor 52 minuta. Najduže vreme za obnavljanje čitavog fosfora u frakciji potrebno je nukleoproteidima. Prema ovom kriterijumu šećeri bi morali biti na čelu, a nukleoproteidima na repu lanca. Ispred ovih nalazili bi se fosfolipoidi. Na prednjem kraju, odmah iza šećerne frakcije, najpre bi, po ovom kriterijumu, došla labilna, a odmah zatim stabilna frakcija.

Apsolutna količina otpuštanja fosfora tokom prva dva sata (putem razlaganja frakcije), takode može poslužiti kao samostalan kriterijum za ustanovljavanje redosleda prenošenja fosfora (kolona 9 tablice br. 1). Odmah pada u oči da šećerna grupa, labilna i stabilna frakcija ATP-a tokom prva dva sata otpuste jednake količine fosfora sa onim koje su za to vreme same primile, te time svoju koncentraciju drže na istom nivou, neizmenjenu. Najmanju apsolutnu količinu fosfora (ravnu petnaestini od primljene količine za to vreme) otpuštaju tokom prva dva sata nukleoproteidi; jedanest puta veću količinu prime (nego što u

OSNOVE ZA KRITERIJUM	NAZIV FRAKCIJE						
	ŠEĆERI	LABILNI P IZ ATP-2	STABILNI P IZ ATP-2	ADENILNA KISELINA	KOFERMENTI	NUKLEO PROTEINI	FOSFO LIPOIDI
SPECIFIČNE BRZINE SINTEZA $K^2$	$39 \times 10^2$	$656 \times 10^2$	$9,066 \times 10^2$	$6,742 \times 10^2$	$802 \times 10^2$	$209 \times 10^2$	$12,45 \times 10^2$
SPECIFIČNA BRZINA RAZLAGANJA $K^2$	$309 \times 10^2$	$277 \times 10^2$	$232 \times 10^2$	$705 \times 10^2$	$53,61 \times 10^2$	$450 \times 10^2$	$675 \times 10^2$
PROCENTUO OBNAVLJANJE FRAKCIJE TOKOM PRVA DVA SATA	307%	277%	288%	90,5%	92,5%	450%	675%
ABSOLUTNO OBNAVLJANJE FRAKCIJE U mgr TOKOM PRVA 2 h	25,45	75,5	277	165	125	402	765
VREME OBNAVLJANJA FRAKCIJE IZRAŽENO U MINUTAMA	37 min	43 min	52 min	170 min	225 min	615 min	621 min
ABSOLUTNO OTPUŠTANJE FOSFORA IZ FRAKCIJE TOKOM PRVA 2 h	25,45 mgr	75,5 mgr	277 mgr	116 mgr	0,67 mgr	0,247 mgr	0,05 mgr
ABSOLUTNO PRENOŠENJE FOSFORA DUŽ CELOG LANCA U mgr	335 mgr	838 mgr	119 mgr	222 mgr	19,3 mgr	72,3 mgr	418 mgr
EKVIV Prenošenje FOSFORA DUŽ CELOG LANCA TOKOM JEDNOG CIKLUSA	24,00	42,00	4,50	1,80	1,00	4,00	6,00

Grafikon br. 1.

periodu prva 2 h oslobode) fosfolipoidi, dok kofermenti u tom periodu prime oko 2 puta više nego što otpuste, itd. Prema ovom kriterijumu opet se na čelu lanca nalazi šećerna grupa, dok se na repu nalaze nukleoproteidi. Skoro uporedo sa njima nalaze se fosfolipoidi i kofermenti. Adenilna kiselina ima relativno veliku sposobnost otpuštanja fosfora tokom prva dva sata, te dolazi odmah iza stabilne frakcije ATP-a.

Sasvim nov kriterijum dobijamo ako sve frakcije lanca analizujemo kao celinu. Razume se da je teško analizovati nešto što još nije definisano (naime mi još uvek tražimo mogući reakcioni poredak, a želimo da ga analizujemo kao da je već poznat). Mada još ne znamo njegov stvarni poredak, ipak je moguće izračunati neke podatke iz perspektive cele grupe. Osnova za to sadržana je u sledećem. Ako prenošenje fosfora ima lančasti karakter, te u lancu učestvuju sve organske frakcije jetre, onda treba da vidimo koje je vreme potrebno da se fosfor obnovi u celom lancu. U prethodnom izlaganju pokazano je da će to svakako morati biti ravno vremenu obnavljanja najsporiije frakcije. Već su u tablici br. 1 izračunate veličine obnavljanja svih frakcija iz perspektive obnavljanja nukleoproteida kao najsporiije frakcije u jetri pasova. Uzeli smo da je jedan ciklus prenošenja fosfora kroz čitavi lanac završen u vremenu u kome se obnovi sav fosfor u nukleoproteidima (ovo je utoliko više opravdano, što nukleoproteidi završavaju ciklus ne samo kvantitativno, a prema većini dosadašnjih kriterijuma i po redosledu). Ako u jednom ciklusu prenošenja duž čitavog lanca obnavljanje samih nukleoproteida označimo sa 1 (ili sa 100%, kako je učinjeno u koloni 5 tablice br. 1), tada se za to vreme posebno obnavljanje pojedine frakcije može iskazati brojevima iznetim u istoj koloni. Ova su vremena grafički prikazana i u grafikonu br. 1.

Iz ovih cifara moguće je stvoriti još jedan novi kriterij, ako se brojevi obnavljanja celih ciklusa pojedinih frakcija pomnože sa svojim stacionarnim koncentracijama. Tada se mogu uporediti apsolutne količine izražene u miligramima prenošenja fosfora kroz sve frakcije za vreme koje je potrebno da se obnovi jedan ciklus čitavog lanca. Kolona 6 tablice br. 1 sadrži baš ove podatke. Da bi se obnovila cela količina fosfora (73,3 mg) u nukleoproteidima, šećerna grupa mora preneti 47,3 puta svoju celu koncentraciju, što u miligramima fosfora iznosi: 395. Za isto vreme labilna frakcija će preneti 43 puta svoju koncentraciju (238 mg) fosfora, stabilna frakcija ATP-a preneće svoju čitavu koncentraciju 35,5 puta, što iznosi 119 mg fosfora. Istovremeno adenilna kiselina preneće svoju koncentraciju fosfora svega 10,85 puta, što iznosi 25,2 mg. Kofermenti će preneti 19,3 mg, a fosfolipoidi 115 mg.

U koloni 8 tablice br. 1 nalaze se brojevi koji mogu označavati kako pojedine molekule, tako i ekvivalente prenošenja za vreme trajanja jednog ciklusa čitavog lanca. Pri izradi grafikona br. 1 sve ekvivalente pomnožili smo sa 2, da bi vrednosti u frakcijama adenilne kiseline i stabilnog ATP-a bile iskazane takode u celim ciframa.

## 2. Pokušaj rekonstrukcije reakcionog poretka metabolizma fosfora u jetri pacova

Pre nego što predemo na pokušaj rekonstrukcije mogućeg poretka prenošenja, smatramo za potrebno da objasnimo neke podatke iz kolona 7 i 8 (Vidi tablicu br. 1).

1) Najpre želimo ukazati na to da su cifre (ekvivalenti) prenošenja, koje su ucrtane u šemu poretka, pozamljene iz kolone 8 tablice br. 1. Ovi podaci na uprošten način prikazuju količine (ekvivalentno) transporta, te služe kao prvoklasni pokazatelji sposobnosti frakcije da na određenom mestu snabdeva lanac potrebnim količinama fosfora. Između ovog i ostalih kriterijuma prvenstveno mora postojati usklađenost.

Već je napred izneto da cifre u koloni 8 tablice br. 1 prikazuju količine transporta frakcija u periodu postignute ravnoteže obnavljanja za razmak vremena od 1845 minuta (period ciklusa lanca). Izuzev nukleoproteida (a i fosfolipoida), sve su frakcije u tom periodu obnovile svoj fosfor mnogo puta, predavši ga svaki put dalje. Pri tom stacionarna koncentracija ostaje neizmenjena, mada se neprekidno iznova formira i rastura, saglasno veličinama specifičnih brzina sinteza i razlaganja frakcije, kao i proporcionalno kvadratu apsolutne količine transporta. Kako apsolutna količina prenošenja fosfora u kranjoj liniji zavisi (za sve frakcije) od količine glukoze u hrani, to znači da koncentracija svih frakcija neprekidno zavisi od svih tih dinamičnih veličina.

2) Smatramo da je korisno najpre ustanoviti opšte uslove koje mora ispuniti svaka frakcija na mestu koje joj pripada u redosledu prenošenja fosfora. Tako napr. prednje frakcije lanca moraju imati takve kapacitete transporta da mogu zadovoljiti potrebe primanja kasnijih članova koje one snabdevaju fosforom. Pri tom ovi prednji članovi moraju imati naročito obezbeđen dovoljan kapacitet otpuštanja fosfora i to već u prvim časovima prenošenja. Napr. za fosfolipoide bi se moglo pretpostaviti da po kapacitetu prenošenja tokom ciklusa celog lanca, kao i prema kapacitetu primanja u prva 2 h dolaze skoro uporedo sa stabilnom frakcijom ATP-a (koja ima inače velik kapacitet prenošenja). Međutim puni kapacitet otpuštanja fosfolipoidi (kao što smo već naveli) postižu tek u 1369 minutu, dok je tokom prvih sati otpuštanje fosfora iz njih minimalno. To znači da oni u prvim satima ne mogu u dovoljnoj količini biti snabdevači drugih frakcija. Činjenice ipak pokazuju da ostale frakcije nisu otkrile postojanje slabog kapaciteta svog snabdevanja, dakle ni zavisnost od fosfolipoida.

3) Dalje se vidi da pojedine frakcije za položaj u lancu imaju protivrečne uslove, jer po izvesnim kriterijumima dobivaju određeno mesto u redosledu, dok drugim sasvim drugo. Postavlja se pitanje koji će kriterijum biti odlučujući za redosled. Treba dalje istaći da svi kriterijumi nemaju podjednak značaj, tj. podjednaku obavezu. Neki samo pokazuju na principijelnu mogućnost zauzimanja određenog položaja, dok drugi decidirano isključuju takvu mogućnost, te su prema tome obavezni. Uzmimo primer adenilne kiseline i nukleoproteida. Prema kriterijumu specifične brzine sinteza adenilna kiselina treba da zauzme mesto u lancu iza nukleoproteida, dok bi prema kriterijumu specifične brzine razlaganja njihov raspored u lancu trebalo da bude obrnut; i prema apsolutnoj količini primanja adenilna kiselina bi takođe trebalo da je iza nukleoproteida, a prema apsolutnoj količini otpuštanja fosfora obrnuto. Koji je kriterijum tačan? Ako pak uporedimo količinu primanja jedne i otpuštanja druge komponente ili obratno, možemo videti da se one uzajamno nikako ne mogu snabdevati fosforom: u prva dva sata nukleoproteidi primaju 4,82 mg, a adenilna kiselina otpušta svega 1,16

mg, dok adenilna kiselina u to vreme prima 1,63 mg, a nukleoproteidi otpuštaju samo 0,317 mg. Prema tome ni jedna od njih ne može u prva dva sata snabdeti onu drugu fosforom u punom kapacitetu. Dakle ni jedan od pomenutih kriterijuma, posebno uzetih, nema decidiranu vrednost. Zaključak je da obe frakcije moraju doći na kraj lanca, ali ne u međusobnom redosledu, već uporedo, pošto je svaki njihov uzajamni redosled isključen kapacitetima primanja i otpuštanja obeju frakcija.

Iz toga proizlazi da se odluka mora osloniti na kombinaciju svih, ili barem većeg broja neobaveznih i naročito na obavezne kriterije za pojedinu frakciju. Kao polaznu osnovu za raspored redosleda uzeli smo kriterijum prema kvantitativnom poretku prenošenja duplog broja ekvivalenata (kolona 8 tablice br. 1), a ostale kriterijume upotrebili smo obično za korekciju mogućeg ili isključenog mesta u redosledu.

Zanimljivo je da svi analizovani kriterijumi unisono šećernoj grupi određuju položaj na čelu lanca. Nema ni jednog kriterija koji bi im to mesto osporavao. Ovo je još jedna nova potvrda za ispravnost Hevesy-evog zaključka da šećeri funkcionišu kao regulatori sinteze fosfornih organskih jedinjenja u jetri pacova. Stoga smatramo da prenošenje fosfora preko šećera bez rezerve možemo staviti na čelo čitavog lanca organskih frakcija. Ovde postoji samo jedan prigovor, koji ne proizlazi ni iz naših kriterija, niti iz Hevesy-evih eksperimenata, već iz istraživanja encimologa. Prema reakcionoj šemi koju iznosi Breusch (2) šećer može ući u proces svoga razlaganja samo ako prethodno primi dva organski vezana fosfora od labilne frakcije ATP-a. Smatrali smo da nam je dužnost i ovaj prigovor uzeti u obzir kod sastavljanja lanca, mada ne proizlazi iz naših kriterijuma. On u suštini ne menja našu šemu. Naprotiv, on je samo upotpunjuje, a ujedno i koriguje za 10% u pogledu izvora fosfora kojim se snabdeva šećerna grupa. Šta više kada ovaj prigovor ne bi postojao, naša bi šema imala priličnu teškoću u II stadijumu fosfornog transporta, jer u poslednjim članovima lanca nema frakcija sa potrebnim kapacitetima primanja da ove ekvivalente prihvate. Pošto smo u šemi uzeli dvostruki broj ekvivalenata iz kolone 8 tablice br. 1, izlazi da šećerna grupa prenosi na frakcije čitavog lanca u po dva ciklusa po 42 ekvivalenta fosfora.

Pošto smo na taj način i pomoću opisanih kriterijuma ustanovili položaj šećera u lancu, treba da vidimo koja frakcija zauzima mesto iza njega. Svi kriterijumi daju labilnoj frakciji mesto odmah iza šećera, što bi trebalo da znači da joj to mesto nije osporeno. Međutim time nije rešen i ceo problem primanja fosfora od šećera, jer labilna frakcija ATP-a ima kapacitete sposobne da prime svega 26 (možda čak i svega 25?) ekvivalenata u toku dva uzastopna ciklusa, dok šećerna grupa za isto vreme prenosi čitavih 40 (ili 42) ekvivalenata. Treba dakle naći još jednog ili nekoliko partnera labilnoj frakciji ATP-a. Kao partneri sa približno podjednakim kapacitetima prenošenja dolaze principijelno u obzir dve frakcije, a to su: stabilna frakcija ATP-a i fosfolipoidi. Za stabilnu frakciju ne postoji nijedan kriterijum, koji bi njen položaj blizu čela lanca činio spornim, te ona po svim kriterijumima ima uslove da zauzme mesto kako neposredno iza labilne frakcije, tako i uporedo sa njom. Nije nam poznat mehanizam primanja stabilnog fosfora iz



ATP-a (čini nam se da je uopšte nepoznat), ali prema našim kriterijumima ATP prima svoj stabilni fosfor neposredno od šećera uporedo sa labilnim fosforom. Za fosfolipoidne postoje doduše kriteriji da mogu biti uporedo sa stabilnom frakcijom ATP-a, ali postoje isto tako i suprotni kriterijumi, koji zahtevaju da oni budu na zadnjem kraju lanca. Naravno, čito je težak prigovor da oni sa fosforom, koji otpuste u toku prva dva sata, ne mogu snabdeti ni jednu frakciju potrebnim kapacitetom fosfora. Iz oba razloga smatramo da je verovatnije da je stabilni fosfor onaj partner koji u lancu zauzima mesto neposredno iza šećerne grupe, a uporedo sa labilnim fosforom iz ATP-a. Fosfolipoidi bi morali imati posebno mesto u lancu, ukoliko želimo udovoljiti zahtevima svih kriterijuma.

Ako tako postavimo tri pomenute frakcije u dva stepena prenošenja, onda je prihvatanje fosfora koga oslobađa šećerna grupa iscrpno svega za 93%, jer šećeri prenose 42 ekvivalenta, u toku dva ciklusa čitavog lanca. Za 7% fosfora iz šećera ne možemo da nademo prihvatne kapacitete, za koje bi odgovarajući kriteriji dozvoljavali da ih postavimo odmah iz šećerne grupe. Bilo bi možda moguće tražiti rešenje u pretpostavci da se deo fosfora oslobađa iz glikogena posle završne sinteze, prelazeći u neorganski (ili obratno pri pretvaranju glikogena u glukozu, koja zatim odlazi u krv). Ovo pitanje moramo ostaviti otvoreno. Mislimo da ovaj mali nedostatak prenosilaca za odvoz fosfora sa šećera ne mora (ukoliko se ne nađu ozbiljniji prigovori, koji obavezno čine naš lanac nemogućim) dovesti do zaključka da je uloga šećera u lancu neusklađena.

Pošto smo najzad rešili koje frakcije nužno zauzimaju prve dve stepenice transportnog lanca, pokušaćemo da ustanovimo šta se nalazi u trećoj stepenici. Labilnu i stabilnu frakciju ATP-a moramo, iz analitičkih (tj. laboratorijskih) razloga, tretirati kao dve posebne frakcije (a verovatno i zbog mehanizama njihovih sinteza i razlaganja, kao i njihovih uloga u metabolizmu). U našoj šemi zauzeli su posebno mesto i kao celina, ali se tamo pojavljuju samo figurativno kao jedinstvena frakcija ATP-a sa 39 ekvivalenta fosfora. Ovo je učinjeno jedino zato da bi se videlo da kao takvi postoje, s tim da njihov ekvivalent predstavlja samo ponovljenu vrednost iz drugog stepena prenošenja, prikazanog sada u jedinstvenoj cifri. Potrebno je da se ovo ima u vidu kod eventualnih sumacija ekvivalenta iz šeme i onih iz kolone 8 tablice br. 1.

Prema tome treći stepen prenošenja u šemi polazi tek od 13 ATP-a. Sledeći član prenošenja mogu biti samo fosfolipoidi, zato što nekoliko njihovih kriterijuma zahtevaju da budu postavljeni negde blizu čela lanca. S druge pak strane oni ne mogu doći kao međučlan između ATP-a i kasnijih frakcija lanca, jer postoji prigovor da u prva dva sata nemaju dovoljan kapacitet odavanja fosfora. Velika sposobnost primanja uz malu sposobnost odavanja daje fosfolipoidima posebno mesto u lancu. Prema sposobnosti primanja mogli bi biti stavljeni uporedo sa stabilnom frakcijom ATP-a, ali po brzini otpuštanja dolaze među poslednje frakcije lanca. Ova dva suprotna kriterijuma se isključuju samo dok pokušavamo da fosfolipoidne postavimo u glavnu osovinu lanca. Međutim oni se mogu lepo nadopuniti ako ih postavimo u bočnu granu lanca. Tada fosfolipoidi

mogu biti postavljeni napred, odmah iza ATP-a, a ujedno mogu biti i jedini (dakle poslednji) član svoje bočne grane. Time položaj fosfolipoida u lancu ipak nije sasvim definisan, jer fosfolipoidi moraju ne samo po našim kvantitativnim kriterijumima, već i prema izvoru iz koga primaju drugu svoju komponentu, doći čak uporedo sa obe frakcije ATP-a, tj. odmah iza grupe šećera. To se odnosi na poreklo njihove glicerinske komponente. Glicerinska komponenta može u fosfolipoidu ući kao gotov produkt iz masti, ali nije nemoguće da glicerol dolazi i iz razloženih proizvoda glukoze. Poznato je da svaki molekul glukoze može proizvesti dva molekula glicerofosfata. Ipak odnos fosfolipoida prema glukozi nije identičan sa odnosom obih frakcija ATP-a (labilne i stabilne) prema njoj, jer za fosfolipoidne nije utvrđeno da svoj fosfor predaju drugim organskim radikalima, niti se njihova glukoza razlaže dalje od stepena glicerina u samom procesu prenošenja fosfora (dok se glukoza, koja služi snabdevanju stabilne i labilne frakcije ATP-a fosforom razloži do kraja). Ova razlika ispoljila se i u našoj šemi prenošenja, jer je za sintezu 12 ekvivalenata fosfolipoida u lancu obezbeđeno posebnih 6 molekula glukoze (iz kojih će najpre nastati 12 glicerofosfata). Glicerofosfati u vidu stepena stoje u šemi samo figurativno (kao intermedijerni stupanj), ali njihovi ekvivalenti u našim tablicama nisu iskazani posebno. Kako su za aktivisanje svake glukoze potrebna dva fosfora iz labilne frakcije ATP-a, to je za sintezu 12 glicerofosfata neophodno dovesti unazad — retrogradno — do stepena slobodne glukoze 12 ekvivalenata fosfora iz trećeg fosfora ATP-a.

Pošto prema našim podacima izlazi da su fosfolipoidi poslednji član svoje bočne grane u prenošenju organskog fosfora, ostaje da vidimo koju sudbinu doživljuje taj fosfor, jer posle 1369 minuta čitav fosfor fosfolipoidne frakcije biva zamenjen novim fosforom. Za jedan deo fosfolipoida Hevesy možda ima rešenje, našavši da do 24% fosfolipoida kao celi melokuli napuštaju jetru tokom 24 h, prelazeći u krv, a iz ove ubrzo zatim u razne organe. Šta biva sa ostatkom fosfolipoida, koji ostaje u jetri nije nam poznato, niti smo u literaturi naišli na neke indikacije, koje bi mogle dati ideju o tome pitanju. Ostaje dakle u celini otvoreno pitanje sudbine fosfora iz fosfolipoida nastalih u jetri.

Obzirom da su kapaciteti prihvatanja u fosfolipoidima sposobni primiti samo 12 ekvivalenata drugog labilnog fosfora iz ATP-a, dok ovaj otpušta jedan ekvivalent fosfora više (tj. ukupno 13 ekvivalenata) potrebno je ispitati kuda odlazi taj jedan ekvivalent fosfora. Možda ćemo moći lakše da odgovorimo na ovo pitanje ako najpre proučimo sudbinu ADP-a\*) koji ostaje posle otpuštanja trećeg (krajnjeg labilnog) atoma fosfora iz ATP-a.

Iz preostalih 13 ekvivalenata Adenozin-Di-Phosphata (ADP) principu mogu nastati molekuli slobodne adenilne kiseline, koji i kao celina mogu biti ugrađeni u strukturu kofermenata, odnosno nukleoproteida.

Pošto adenilna kiselina u lancu stvarno postoji ne samo u vezanom, već i u slobodnom stanju, to ćemo najpre proučiti njeno mesto u lancu. U našoj šemi se vidi da se tokom dvaju nukleoproteidskih ciklusa u adenilnoj kiselini obnavljaju 3 ekvivalenta fosfora. Kako za vreme dvaju

\*) ADP = Adenozin-Di-Phosphat.



ciklusa obnavljanja fosfora u čitavom lancu organskih frakcija jetre, frakcija ADP učestvuje sa 13 ekvivalenata, jasno je da adenilna kiselina sa svoja 3 ekvivalenta obnavljanja ne može biti jedini potrošač fosfornih komponenata iz ADP-a. Međutim sa tri ekvivalenta ona je u stanju da vrši ulogu parcijalnog sledbenika ADP-a. Da bi se iz ADP-a dobila slobodna adenilna kiselina, ADP mora najpre otpustiti svoj drugi labilni fosfor. U tom slučaju, pored 3 ekvivalenta slobodne adenilne kiseline, dobićemo još i 3 ekvivalenta slobodnog, energetski bogatog labilnog fosfora, sposobnog da se veže na druge organske radikale. Ovome treba dodati i ranije pomenuti ekvivalentat viška labilnog fosfora oslobođenog iz ATP-a uporedo sa procesom prenošenja 12 ekvivalentenata labilnih fosfora na fosfolipoide. Dosada smo rešili redosledna mesta u lancu prenošenja za sve frakcije osim za nukleoproteide i kofermente, koji prema nekim kriterijima treba da zauzmu uporedna mesta na završetku lanca. Moglo bi se pretpostaviti da oni možda mogu primiti ova četiri ekvivalenta slobodnog labilnog fosfora (jedan raniji fosfor iz ATP-a; tri nova fosfora iz ADP-a, oslobođenih u procesu stvaranja slobodne adenilne kiseline). Već smo napred ukazali na činjenicu da nukleoproteidi i kofermenti ne vezuju posebni labilni fosfor, već isključivo čitave mononukleotide. Prema tome oni ne mogu biti potrošači ovih 4 ekvivalenta labilnog fosfora oslobođenih iz ATP-a i ADP-a. Ostaju samo dve mogućnosti: ili da se ova 4 ekvivalenta »degradiraju« na stupanj matičnog neorganskog fosfora, ili da nađu drugog organskog potrošača u lancu ili izvan njega. Naš lanac bi mogao da im pruži potrošača samo u prvoj organskoj komponenti lanca, tj. u grupi šećera. Ako je to tačno, morala bi postojati potreba da šećerna grupa veže labilni fosfor iz ATP-a odnosno iz ADP-a. U našem lancu to bi moralo naći odraza i u ekvivalentima šećera koji unose fosfor u lanac organskih frakcija. S obzirom da je za dalje zaključke od velikog značaja, pokušaćemo da ustanovimo broj ekvivalentenata glukoze potrebnih da prenesu 42 ekvivalenta fosfora u ostale članove lanca. Breutsch citira (2) nekoliko eksperimenata u kojima je ispitivano koliko se ekvivalentenata fosfata može preneti u organske spojeve na osnovu potpune oksidacije glukoze, polazeći od činjenice da svaki mol organskog fosfata sobom nosi oko 11 do 17 Kcal, ako je u lako hidroliziranim spojevima, odnosno oko 2 do 4 Kcal, ako je esterski vezan. Ochoa (11) je ustanovio da pri oksidaciji glukoze svaki mol potrošenog kiseonika ( $O_2$ ) proizvede maksimalno 4 mola organski vezanog fosfata. To znači da 6 mola kiseonika (koliko se troši za oksidaciju jednog mola glukoze) može proizvesti 24 mola organski vezanog fosfora. Lipmann (7, 8) je došao do istog nalaza kao i Ochoa, ali na osnovu kalkulacije redokspotencijala kod razlaganja glukoze. Pošavši od činjenice da se sva energija od razlaganja glukoze oslobađa tek prilikom oksidacije  $12 \times 2H = 24H$  izdvojenih iz jedne glukoze (tačnije: iz dvaju molekula pirogroždane kiseline), Lipmann je sastavio šemu oksidacije, u kojoj je rasporedio gradijent opadanja redokspotencijala, kao i sukcesivna mesta stvaranja organski vezanih fosfata. Iz njegovog proračuna takođe izlazi da proizvodnja 24 mola organski vezanih fosfata nastaje putem oksidacije  $12 \times 2H$  iz glukoze.

Kako u našem lancu postoji višak transporta od 4 ekvivalenta labilnog — organski vezanog — fosfora, bilo bi moguće njima aktivisati

dva mola glukoze. Ova se činjenica sasvim lepo slaže sa rezultatom do kojih su došli Ochoa (11) i Lipmann (7, 8). Naime pomoću dva ekvivalenta glukoze može se preneti 48 akvivalenata organski vezanog fosfata, što za 6 ekvivalenata premašuje kapacitet prenošenja glukoze u našem lancu. Čak je naš kapacitet prenošenja prevelik, što se vidi i iz činjenice da šećerna grupa našeg lanca prenosi 3 ekvivalenta više od kapaciteta primanja sledećih članova lanca. Ovo bi možda trebalo tumačiti tako, da se ima uzeti da ova tri ekvivalenta bivaju vraćena neorganskoj frakciji direktno iz samih šećera (napr. posle završene sinteze glikogenskih molekula, ili posle proizvodnje glukoze iz glikogena za regulaciju krvnog šećera?). Prema tome moramo se saglasiti da su za prenošenje 42 ekvivalenta fosfora sasvim dovoljna dva mola glukoze. Višak ekvivalenata labilnih fosfora, kojima ne možemo naći potrošače u zadnjem delu lanca, mogu dakle biti ekvivaletno potrošeni jedino u prvom članu lanca. Stvar bi izgledala tako da svaki ekvivalenat šećera prenosi u lanac ne samo količinu fosfora potrebnu za udovoljenje svih afiniteta frakcija lanca, već daje i višak od dva labilna fosfora iz ATP-a, koji se vraćaju na čelo lanca, služeći za pokretanje novog ciklusa. Prema tome pomoću ekvivalenata retrogradno vraćenog labilnog fosfora ostvaruje se autoregeneracija lanca. Za pokretanje svakog ciklusa dovoljan je jedan ekvivalenat glukoze, koji sam biva aktivisan pomoću dva ekvivalenta labilnog fosfora iz prethodnog ciklusa, a budućem ciklusu stavlja na raspoloženje ta dva ekvivalenta labilnog fosfora. Za slučaj da se smanji količina šećera u hrani, opašće i njegova količina u jetrinim ćelijama. Tada će se i stepen regeneracije ciklusa takođe smanjiti, te će i kapacitet prenošenja čitavog lanca biti smanjen. S druge strane porast količine šećera morao bi takođe u samom lancu imati mogućnost da putem proširenja regeneracije poveća količinu fosfora u lancu. Da vidimo da li naši ekvivalenti otvaraju takve perspektive? Na prvi pogled vidimo da u našem lancu postoje razne rezerve slobodnih ekvivalenata labilnog fosfora, pogodnih za autokatalizu regeneracije narednog ciklusa prenošenja fosforne kiseline. Ne bi morala biti isključena mogućnost, da pojava viška šećera dovodi do delimične derivacije izvesne količine organskog fosfora sa drugih smerova prenošenja. Ne vidimo prepreku da se neiskorišćene rezerve fosfora u samoj grupi šećera upotrebe za povećanu proizvodnju ATP-a, čime se stvara osnova za uvođenje novih glukoza u lanac. Svaki ekvivalenat nove glukoze nosi maksimalno 24 novih organskih fosfata, Retrogradna derivacija nazad ka šećerima bila bi moguća i iz procesa stvaranja fosfolipoida, jer se tamo labilni fosfor iz ATP-a inače dovodi nazad ka šećernoj grupi, i to u šest puta većoj količini ekvivalenata, nego što se inače troši za autoregeneraciju ciklusa. Ovi šećeri, dobivši labilni fosfor, umesto da se na stupnju glicerofosfata odmah ugrađuju u fosfolipoide, mogli bi biti upotrebljeni za proširenu regeneraciju ciklusa, itd.

Prema tome slobodni višak labilnih fosfora iz redovnog prenošenja u ciklusu služi za normalnu regeneraciju lanca, dok bi neiskorišćeni višak (kao i prikrivena rezerva fosfora koja se inače troši za sintezu fosfolipoida) mogla principijelno služiti za proširenu regeneraciju lančastog ciklusa. Proširenje ili suženje lančastog ciklusa, putem ovog mehanizma,

bilo bi u krajnjoj liniji uvek regulisano (po zakonu o delovanju aktivnih masa), koncentracijom šećera koji se jetri donosi putem hrane, kao što je već u svojim eksperimentima pokazao Hevesy.

Iz naših ranijih izlaganja vidi se da frakcije adenilne kiseline, kofermenata i nukleoproteida moraju stajati na završetku lanca — na zajedničkom stepenu — pošto ni jedna od ovih triju frakcija ne može služiti kao uzajamni snabdevač fosforom one druge: svaka od njih ima znatno veći kapacitet primanja od kapaciteta otpuštanja fosfora. Za adenilnu kiselinu već smo videli da se nalazi u lancu iza ADP-a. Međutim pre nego što predemo na ustanovljavanje mesta kofermenata i nukleoproteida u lancu na osnovu njihovih ekvivalenata prenošenja, bilo bi korisno malo da pronalizujemo opšti položaj i ulogu adenilne kiseline u lancu.

Kada smo pokušali da konstruišemo lanac prenošenja, smatrali smo da sve grupe organskih frakcija koje u strukturi imaju mononukleotid adenilne kiseline, moraju biti u međusobnoj transportnoj vezi. Izgledalo nam je najprirodnije da se u jetri najpre stvori slobodna adenilna kiselina kao najjednostavnija frakcija, koja bi zatim bila upotrebljena kao osnova za sintezu ostalih frakcija (jer se adenilna kiselina nalazi ugrađena u njihovoj strukturi). Na ovakvu misao došli smo putem analogije sa mišićnim ATP-om, koji nastaje iz slobodne adenilne kiseline i energetski bogatog fosfora (iz kreatin-fosforne kiseline). Očekivali smo da će se najjednostavnija takva upotreba ispoljiti već u sintezi samog ATP-a. Međutim lančasti ciklus u dva uzastopna obnavljanja unese 13 ekvivalenata adenilnih kiselina u strukturu ATP-a, a i odnese isto toliko. U isto vreme u nukleoproteide se ugradi 8 novih ekvivalenata mononukleotida adenilne kiseline, a u kofermente još dva. U svemu u dva kruga lančastog ciklusa obrazuje se i razgradi 23 ekvivalenta ugrađene adenilne kiseline. Očigledno je da slobodna adenilna kiselina, sa svega svoja 3 ekvivalenta obnavljanja ne može u dva kruga ovog ciklusa istovremeno snabdeti sve tri frakcije. Ona bi po svom ukupnom kapacitetu prenošenja mogla snabdeti jednu jedinu i to samo najmanju frakciju od njih, tj. kofermente (koji tokom dva kruga primaju svega 2 ekvivalenta fosfora). Međutim ako uporedimo kapacitete prenošenja ovih frakcija tokom prvih dva sata, vidimo da za to vreme kofermenti prime 1,25 mg, dok je za to vreme sposobna adenilna kiselina da otpusti samo 1,16 mg što znači da slobodna adenilna kiselina ne može biti snabdevač čak ni ove najmanje frakcije. Još je gora situacija u pogledu snabdevanja ATP-a i nukleoproteida. ATP obnovi tokom prvih dva sata oko 6 puta veću količinu vezane adenilne kiseline, nego što slobodna adenilna kiselina može otpustiti, o blizu pet puta više nego što se uopšte i stvori slobodne adenilne kiseline (prema našim ekvivalentima). Dakle adenilna kiselina nikako ne može biti korišćena kao sirovina za ugrađivanje u strukture ni jedne od pomenutih frakcija, mada ove u sebi inače sadrže vezanu adenilnu kiselinu. Prema količini otpuštanja ni kofermenti ni nukleoproteidi ne mogu biti snabdevači ATP-a sa potrebnom količinom vezane adenilne kiseline, jer obe ove komponente na kraju drugog sata, čak ni skupa, ne mogu osloboditi ni onu malu količinu koju u to vreme inače oslobodi sama adenilna kiselina. Prema tome ove

dve frakcije (čak i udružene) ne mogu u prva dva sata podmiriti ni šestinu količine koju u to vreme potroši ATP za sopstvenu sintezu.

Ako ovim argumentima dodamo još i podatke iz ranije opisanih kriterija, čini nam se da je sasvim nužan zaključak da kofermenti i nukleoproteidi svoje vezane adenilne kiseline mogu dobiti jedino iz neiskorišćenih viškova ekvivalenata ADP-a. Ovih 10 ADP-a mogli bi u principu takođe sadržati i skrivenu rezervu od 10 ekvivalenata labilnog fosfora za proširenu regeneraciju. Čini nam se da ipak prednost imaju oni labilni fosfati, koji se prilikom stvaranja fosfolipoida već zbog svog redovnog prenošenja vezuju za glukozu. Postoji i drugi razlog koji govori u prilog da se ovih 10 ekvivalenata labilnog fosfora troše na drugom mestu.

Videli smo da je posle prenošenja 12 ekvivalenata trećeg fosfora (labilnog) na frakciju fosfolipoida i jednog povratnim putem na šećere za regeneraciju ciklusa, preostalo još 13 ekvivalenata ADP-a od kojih su tri utrošena za proizvodnju slobodne adenilne kiseline, dok je 10 ekvivalenata ADP-a slobodno za dalje reakcije. Kako nukleoproteidi u dva kruga svog ciklusa prenošenja učestvuju sa 8 ekvivalenata, a kofermenti sa 2, vidimo da se time bez manjka i bez ostataka potroši sva količina adenilne kiseline iz frakcije ADP-a, pri čemu se kofermenti i nukleoproteidi potpuno snabdeju potrebnim količinama mononukleotida.

U vezi ovog prenošenja ostaje jedna na prvi pogled protivrečna činjenica. U 10 ekvivalenata ADP-a sadržano je 20 ekvivalenata fosfora, međutim u 8 ekvivalenata nukleoproteida i 2 ekvivalenta kofermenata biva ugrađeno samo 10 ekvivalenata adenilne kiseline sa 10 ekvivalenata fosfora, dok se 10 ekvivalenata labilnog fosfora iz ADP-a ne pojavljuje ni u jednoj reakciji. S obzirom da se u dva kruga (ciklusa) obnovi 13 ekvivalenata ADP-a, od kojih 3 biva pretvoreno u slobodnu adenilnu kiselinu, a 10 preneseno u dve završne frakcije, sve je u redu, izuzev ovih 10 ekvivalenata labilnog fosfora. Pošto je prenošenje prema svim kriterijumima inače ostvareno u jedino mogućem smeru, onda treba rešiti šta se desilo sa 10 ekvivalenata iščezlog fosfora?! Poznato je da se labilni fosfor može koristiti kako za prenošenje na nove organske komponente, tako i samo za transport energije. Pošto u ovom slučaju nije usledilo prenošenje labilnog fosfora u novu komponentu, jedino ostaje zaključak da je u nju preneti samo slobodna energija iz tih ekvivalenata labilnog fosfora. Analogna pojava već je poznata u Szent-György-evom lancu prenošenja energije sa šećera na sistem miozina u mišićima (19). Zato moramo pretpostaviti da je labilni fosfor iz ADP-a u samom aktu sinteze kofermentske i nukleoproteidske frakcije svoju energiju oslobodio za potrebe vezivanja mononukleotida u strukturu tih frakcija. Pri tom se sam labilni fosfor morao degradirati na nivo slobodnog neorganskog fosfora. Ovo je drugi slučaj, u kome kvantitativni podaci o prenošenju fosfora kroz lanac organskih frakcija nagone na zaključak, da određeni broj fosfornih ekvivalenata biva vraćen nazad ka čeonom kraju lanca.

Kako se sve tri mononukleotidne frakcije (adenilna kiselina, kofermenti i nukleoproteididi) neprekidno obnavljaju, moraju primljeni fosfor dalje preneti (bilo u sastavu mononukleotida, ili kao sastojci

čitavih frakcija, napr. odilaženjem iz jetre — slično onome što je Hevesy ustanovio za fosfolipide). Najzad, postoji mogućnost da se fosfor oslobodi i u neorganskom stanju.

Na kraju poglavlja možemo rezimirati naše pretstave o reakcionom lancu kao jedinstvenom procesu metabolizma. On je u jetri pacova organizovan kao proces lančastog transporta fosfora preko frakcija raspoređenih u tri sukcesivna stadijuma. U prvom stadijumu transport ostvaruje grupa šećernih frakcija; u drugom stadijumu to čini ATP; u trećem (poslednjem) transport ide preko većeg broj heterogenih frakcija.

Sa stanovišta potrošnje, glukoza (zajedno sa intermedijernim proizvodima svog razlaganja) spada u potrošače I reda, jer može neposredno reagovati sa neorganskim fosforom i prenositi ga na ostale potrošače. Tu sposobnost (prema našim kriterijumima) nema ni jedna druga frakcija. Svoj fosfor glukoza ne može prenositi na sve potrošače neposredno. Direktno ga može predati samo labilnoj i stabilnoj frakciji ATP-a, koji je jedini sposoban da vrši ulogu potrošača II reda. Ostale frakcije čine heterogenu grupu potrošača III reda. Ovi su sposobni da se snabdevaju fosforom samo posredstvom labilne ili stabilne frakcije ATP-a (odnosno ADP-a), jer ne mogu reagovati niti sa neorganskim, ni sa šećernim fosforom. Naše analize nisu otkrile dalju sudbinu fosfora iz sastava potrošača III reda. Izuzetno je utvrđeno da se u svakom ciklusu lanca po dva ekvivalenta labilnog fosfora iz ATP-a (odnosno iz ADP-a) iz II stadijuma retrogradno vraćaju nazad u I stadijum, gde aktivišu novi molekul glukoze koja svojim razlaganjem pokreće 21 ekvivalent novih fosfora u lanac. Takođe je poznato da se 5 ekvivalenta labilnog fosfora u svakom ciklusu metabolizma lanca degradira u neorganski fosfor u trenutku, kada stabilni fosfor prelazi iz ADP-a u strukturu kofermenata ili nukleoproteida. O značaju vraćanja ekvivalenta labilnog fosfora iz II-gog u I-vi stadijum već je bilo ranije reči u ovom poglavlju. Na ovom mestu to je zanimljivo, jer pokazuje da glukoza uporedo vrši uloge u I i u III stadijumu transporta. U III stadijumu ona kao potrošač učestvuje svega sa 4 ekvivalenta, dok 38 ekvivalenta uzima iz neorganske matice. Da bi prenela oko 90% neorganskog fosfora u metabolični lanac, glukoza mora prethodno primiti 10% organski vezanog (labilnog) fosfora iz ATP-a (ili ADP-a), čime se aktivise za izvršenje svoje uloge.

Za stadijume prenošenja fosfora karakteristično je da su količine (ekvivalenti) transporta u sva tri stadijuma međusobno jednake (po 39 ekvivalenta u dva, ili po 19,5 ekvivalenta u jednom ciklusu obnavljanja). Izuzetak od tog ponašanja nalazimo u grupi šećernih frakcija, koja ukupno primi 42 ekvivalenta fosfora, dok u lanac unese svega 39. Ranije je već izneta pretpostavka da bi višak od tri ekvivalenta fosforog transporta mogao služiti funkciji regulacije krvnog šećera, ali izvan našeg lanca. Međutim u trećem poglavlju se pokazalo da bi višak mogao nastati na veštački način usled nedovoljno pouzdane osnove za izračunavanje količine transporta u grupi šećernih frakcija.

Karakteristično je da transportni stadijumi u pogledu koncentracija fosfora u svojim frakcijama ne pokazuju analogno ponašanje. Dok je zbir transportnih ekvivalenta frakcija jednog stadijuma ravan zbiru transportnih ekvivalenta ostalih stadijuma, dotle zbir koncentracija

frakcija progresivno raste od početnog do završnog stadijuma. Sve frakcije I stadijuma imaju ukupnu koncentraciju od 8,36 mg na g. jetre, taj zbir u II stadijumu iznosi 8,89 mg, a u III stadijumu 162,95 mg na 100 gr. sveže jetre. Prema tome uz jednake ekvivalente transporta u svim stadijumima, zbirna koncentracija fosfora u njima progresivno raste, da bi u završnom stadijumu oko 20 puta premašila koncentraciju prvog stadijuma. To znači da u odnosu na te dve funkcije, frakcije pojedinih stadijuma pokazuju sasvim različita ponašanja.

Zanimljivo je da kod odabiranja mesta za pojedine frakcije nismo mogli pretpostaviti da će transport pokazati stadijnu organizaciju, pogotovo, da će ona biti zasnovana na ekvivalenciji prenosa. Čak ni sama šema prenošenja nije otkrila tu činjenicu, jer pri rekonstrukciji to nam nije palo u oči. Tek kada je već bio završen celi tekst trećeg poglavlja ovog dela, uočili smo stadijnost transporta i njegovu ekvivalenciju po stadijumima. Zato je ovaj tekst naknadno ubačen u završni deo drugog poglavlja.

Pošto smo ustanovili stadijnost, pomislili smo da je to možda primarna odlika transporta, a da individualno mesto pojedine frakcije nije bitno. Pokušali smo da sumiranjem transporta načinimo i drugi raspored frakcija po stadijumima zadržavajući ekvivalenciju transporta. Pokazalo se da je to nemoguće. Jedino bi moglo doći u obzir da se u II stadijum na mesto frakcije stabilnog fosfora stave fosfolipoidi, jer među njima postoji minimalna razlika u količini transporta. Ali takav pokušaj dolazi u sukob sa sistemom kriterijuma, te se sasvim poremećuje skladnost rasporeda frakcija prema individualnim osobinama i ulogama u pogledu sposobnosti primanja i odavanja fosfora. Dakle stadijnost može zadovoljiti zahtev ekvivalencije jedino ako se najpre udovolji svima individualnim zahtevima kriterijuma svake pojedine frakcije. Iz toga sledi da je stadijnost samo odraz pravilnog rasporeda frakcija na ona mesta transportnog lanca, na kojim jedino mogu ostvariti svoju hemijsku (tj. metaboličnu) ulogu. Prema tome stadijnost i ekvivalencija na svoj način iznova potvrđuju ispravnost šeme reakcionog poretka metabolizma fosfora u jetri pacova.

### 3. Odnos između transportne i akumulacione funkcije u lančastom metabolizmu fosfora

U prethodnom poglavlju raspravljali smo o poretku prenošenja fosfora u jetri pacova posredstvom lanca organskih frakcija. Pri tom nismo raspravili odnos između količina fosfora u transportu i u koncentracijama frakcija, i značaj tih odnosa za sam poredak lanca.

Fosfor se u transportu može pojavljivati u tri razne modifikacije, koje su funkcionalno u čvrstom međusobnom odnosu. To su:

- 1) Proces ulaženja fosfora u sastav frakcije i uticaj na obrazovanje njene koncentracije.
- 2) Proces izlaženja fosfora iz frakcije zavisno od koncentracije.
- 3) Proces transporta (prenošenja) fosfora duž reakcionog lanca, bez izmena samih koncentracija frakcija.

Ova tri procesa najprisnije su povezana sa stacionarnim koncentracijama fosfora u frakcijama. Mada se ispoljava kao stacionarna veličina, koncentracija je u svojoj suštini takođe uključena u proces transporta te je moramo uvrstiti u isti red činjenica uporedo sa gornja tri procesa. Stoga i koncentraciju označujemo kao specifičnu formu transportne pojave.

#### 4) Obrazovanje, održavanje i rasturanje stacionarne koncentracije.

U II delu ove publikacije detaljno je opisano kako smo, upotrebom dveju analitičkih metoda (merenje radioaktivnosti fosfora i njegovo kvantitativno određivanje hemijskom analizom), a zatim koordinacijom rezultata tih dveju vrsta analiza došli do apsolutnih iznosa za pomenute transportne veličine. Prva tri procesa otkriveni su (i izračunate su njihove proporcionalne veličine) analizom unesenog veštačkog radiofosfora. Apsolutne veličine dobivene su naknadno primenom proporcije radioaktivnosti na koncentracije neaktivnog fosfora u frakcijama, koje su određene običnom hemijskom analizom. Primena podataka o porastu radioaktivnosti za izračunavanje apsolutnih vrednosti transporta omogućena je na osnovu jednakih proporcija između sadržaja radioaktivnog i običnog fosfora u frakcijama posle postignute ravnoteže radioaktivnosti u svim frakcijama (tj. posle 1845 minuta od davanja radiofosfora pacovima).

Brojčani podaci o apsolutnim veličinama mogu nam pokazati određene nove pravilnosti transporta, koje se inače ni iz ranijih tablica za reakcione konstante, niti iz šeme prenošenja, direktno ne mogu uočiti. Zato smo apsolutne podatke za gorepomenuta četiri procesa prikupili u zajedničku tablicu, prikazavši neke u tri, a neke, šta više, i u četiri tipa međusobnih relacija. U tablici br. 2 ta četiri tipa prikazivanja iznesena su pod četiri posebne glave. Pod glavom B svi su podaci dati kao apsolutne vrednosti. Pod glavom C neorganska frakcija je uzeta kao 100%, dok su organske iskazane u procentima neorganske frakcije. U glavi D svi su transporti upoređeni sa stacionarnom koncentracijom sopstvene frakcije, koja je za svaku frakciju označena kao 100%. U glavi pod E, zasebno su sabrane sve transportne veličine, a posebno su sumirane i sve koncentracije. Ovdje je zbirna veličina transporta svih frakcije uzeta kao 100% za upoređenje posebnog transporta svake frakcije sa transportom celog lanca (upoređuje se udeo frakcije u odnosu na transport lanca). Slično se upoređuje udeo frakcije u raspodeli koncentracije, u odnosu na ukupnu koncentraciju fosfora iz svih frakcija jetre (vidi kolonu 14 i 15 glave E u tablici br. 2).

Najpre ćemo analizovati glavu B, u kojoj se nalaze posebne kolone za sve četiri vrste transportnih procesa (ulaženje fosfora u frakciju, izlaženje iz nje tokom prva dva sata, transport preko frakcije u toku obnavljanja lanca, tj. tokom 1845 minuta, i kolona za stacionarne koncentracije frakcija). Sve veličine u ovoj glavi označuju apsolutne iznose frakcija. Već na prvi pogled uočljivi su određeni odnosi među veličinama u raznim kolonama za istu frakciju. Vidi se da gornje četiri frakcije (neorganska, šećerna, labilna i stabilna frakcija iz ATP-a) u koloni za ulaženje fosfora imaju (kolona 2) identične cifre sa veličinama svoje frakcije u koloni izlaženja fosfora iz frakcije (kolona 3). Naprotiv cifre u četiri donje frakcije (adenilna kiselina, kofermenti, nukleoproteidi i



fosfolipoidi) kolona za ulaženje fosfora (u periodu posle 2 h — kolona 2) ima znatno veće količine, od kolone za izlaženje fosfora (kolona 3). Različito ponašanje gornjih i donjih frakcija tabele potiče otuda što su gornje četiri frakcije već posle 2 h postigle ravnotežu prenošenja fosfora, dok to u donjima nije slučaj. Kolone 4 i 5 ove glave popunjene su podacima iz kasnijeg transportnog perioda, u kome su i sve frakcije iz donje polovine tabele već dospjele u stanje ravnoteže (posle 1845 minuta).

Ako apsolutne cifre transporta iz perioda jednog ciklusa (kolona 4) uporedimo sa apsolutnim ciframa koncentracija (kolona 5), odmah nam pada u oči da je cifra transporta u svim frakcijama znatno veća od cifre koncentracije, izuzev u frakciji nukleoproteida. Te dve cifre u nukleoproteidima međusobno su jednake za transportni period tokom vremena od 1845 minuta. Transport u frakciji fosfolipoida za isto vreme nadmašio je koncentraciju za svega 35%. Kolona 12 sastavljena je iz cifara koje pokazuju koliko puta transportna količina u ovom periodu (tj. u vremenu potrebnom da se izvrši jedan celi ciklus obnavljanja fosfora duž celog lanca) nadmašuje veličinu koncentracije u frakciji. Vidi se da najveći transport u odnosu na sopstvenu koncentraciju ima neorganska frakcija (73,3 puta se transportuje više nego što iznosi koncentracija). Najmanji transport u odnosu na sopstvenu koncentraciju pokazuju nukleoproteidi. Njihov transport u poređenju sa drugim frakcijama nije doduše najmanji u apsolutnom merilu, jer napr. adenilna kiselina i kofermenti izvršuju manji apsolutni transport od nukleoproteida. Međutim u odnosu na sopstvene koncentracije tih dveju frakcija vidimo da transport u adenilnoj kiselini premašuje sopstvenu koncentraciju za 10,8 puta, dok je proporcija transporta prema koncentraciji u kofermentima 8,3 : 1.

Sasvim drugačije izgledaju cifre u kolonama glave C. Ovde su veličine za neorgansku frakciju (kolona 6—9) uzete kao 100%, a ostale frakcije su preračunate prema toj osnovi. Time se omogućuje uvid u to koliki deo neorganskog transporta prelazi u organski transport, odnosno koliki deo ostaje u koncentraciji neke frakcije u poređenju sa neorganskom koncentracijom. Odmah vidimo da najveći procenat u odnosu na neorganski fosfor prima i transportuje grupa šećera, a najmanje kofermenti, ako kolonu ulaženja fosfora u frakcije posmatramo za prva dva sata. Ako uporedimo veličinu izlaženja fosfora za isto vreme, videćemo da je procenat izlaženja najmanji u nukleoproteidima, dok je istovremeno u frakcijama fosfolipoida i kofermenata izlaženje u tom periodu dva puta veće. Procenti iz kolona 6, 7 i 8 potvrđuju našu tezu da se kod postignute ravnoteže transporta (posle 1845 minuta ravnoteža celog lanca ostvarena), proporcija ulaženja izjednačuje ne samo sa proporcijama izlaženja, već i sa srazmerom prenošenja duž celog lanca, jer su već posle 2 h cifre procenata u gornjim frakcijama glave C izjednačene u kolonama 6 (ulaženja), 7 (izlaženja) i 8 (transporta duž lanca). U donjim frakcijama ove glave ulaženja nadmašuju izlaženje fosfora i u procentnim razmerama. Međutim neočekivan je nalaz da su procenti ulaženja već posle 2 h (ako se upoređuju u procentnoj razmeri — znači proporcionalno) izjednačeni sa procentima transporta posle 1845 minuta. Dok se u glavi B odmah vidi da ulaženje nadmašuje izlaženje, tamo nije evidentno da je proporcija ulaženja u frakcije tokom

2 h identična sa proporcijom transporta tokom 1845 minuta, što postaje evidentno tek pri procentnom upoređivanju. Možda bi se moglo zaključiti da ulaženje odmah služi transportu. To je u jednu ruku tačno, jer ćeone frakcije već vrlo rano otpuštaju velike količine primljenog fosfora, čak i pre nego što je postignuta definitivna ravnoteža. Međutim ako svaku frakciju posmatramo posebno, možemo uočiti da njeno učešće u transportu dostiže punu meru tek kada se izlaženje izjednači sa ulaženjem, tj. kada nastane ravnoteža transporta. Do toga vremena ulaženje se koristi najvećim delom za popunjavanje koncentracije frakcije, a ne direktno za dalji transport. Tek kada koncentracija dostigne onu veličinu koja joj je neophodna da zajedno sa specifičnom brzinom razlaganja frakcije poveća apsolutno izlaženje do visine ulaženja, onda će ulaženje biti potpuno u službi transporta, jer je koncentracija već formirana, te se više ne javlja kao potrošač ulaznog transporta. Šta više moglo bi se pretpostaviti da bi u slučaju sekundarnog smanjenja ulaza, izlaz u početku morao ostati veći, što bi nužno dovelo do pada koncentracije na nivo koji pokreće izlaz u tolikoj meri da bude ravan ulazu.

Očigledno je da je koncentraciju frakcije nemoguće odvojiti od njenog učešća u transportu. Zato će biti korisno da uporedimo međusobni odnos transporta i koncentracije neorganske frakcije (kao liferanta materijala za oba procesa) sa veličinom transportne, odnosno koncentracione uloge drugih frakcija. Ti su odnosi iskazani u kolonama 8 i 9 glave C u tablici br. 2. Odmah se vidi da šećerna grupa učestvuje u transportu fosfora oko pet puta manje od neorganske, dok ostale frakcije sudeluju još znatno manje. Nukleoproteididi učestvuju u transportu sa svega 3,9% u poredenju sa neorganskim transportom, dok fosfolipoidi sudeluju sa 6,12% transporta. Najmanji transport u odnosu na neorgansku frakciju pokazuju kofermenti i adenilna kiselina. Sasvim je druga slika kod učešća frakcije u stvaranju svojih koncentracija. U tablici je neposredno evidentno napr. da je u svim frakcijama proporcija svoje koncentracije prema koncentraciji neorganske frakcije veća od proporcije njihovog transporta prema neorganskom transportu. Tako napr. šećerna grupa (u poredenju sa neorganskim) učestvuje u transportu samo sa 21%, dok u koncentraciji učestvuje sa 32,55%. Ili napr. učešće frakcije nukleoproteida u formiranju svoje koncentracije u odnosu na neorgansku frakciju iznosi 285,2%, dotle njeno učešće u transportu iznosi svega 3,9%. Maksimalno formiranje koncentracije nalazi se u grupi fosfolipoida, kod kojih ta veličina iznosi 330,5 u odnosu na neorgansku frakciju, dok istovremeno ova frakcija učestvuje u transportu sa svega 6,12%. Učešće frakcija u formiranju koncentracija (u poredenju sa tom funkcijom u neorganskoj frakciji), iz sopstvenog transporta progresivno raste od čela do repa lanca (ako se formiranje koncentracije u neorganskoj frakciji prema sopstvenom transportu označi kao 100:100).

Odnos između koncentracije i transporta može se prikazati i iz perspektive celog lanca, što ima određene prednosti od prethodnog načina. Prethodni način je osobito pogodan za upoređivanje tih veličina tokom razvijanja procesa transporta od prvog minuta do stadijuma ravnoteže. Drugi način je moguć jedino posle ravnoteže proticanja. Međutim pošto je kod prvog metoda upoređivanja neophodno neorgansku frakciju za svaki proces svesti na jednaku polaznu tačku, onda se apsolutne veličine različite procese neorganske frakcije uvek izravnavaju

na 100%, tj. uzimaju se izjednačene mada su stvarno veoma različite. Ako se želi uporediti ravnotežni lanac u ranom stadijumu transporta, onda je to jedino upotrebljivi sistem. Međutim, ako se želi uporediti koncentracija sa transportom u kasnim stadijumima, tj. u ravnotežnom lancu, tada je korisnije sabrati transporte svih frakcija u zajedničku veličinu transporta celog lanca, a zatim transporte pojedinih frakcija preračunate u procenete prema zbirnom transportu lanca (koji se uzima kao 100%). U tom slučaju se prema jednakoj osnovi upoređuju organske sa neorganskom frakcijom. Takve proporcije date su u glavi E tablice 2. Vidi se da od ukupnog transporta u lancu na neorgansku frakciju otpada 66,3%, na šećere 13,8% itd. Najmanji transport imaju kofermenti i adenilna kiselina. Ako uporedimo raspodelu ukupne koncentracije lanca (totalnog fosfora jetre) na pojedine frakcije, vidimo da najveće učešće nema frakcija sa najvišim transportom, već fosfolipoidi, a odmah za njima nukleoproteidi, koji inače u transportu lanca vema slabo učestvuju (4,02% i 2,56%).

Prema formuli za izračunavanje koncentracije pomoću reakcionih konstanti (utvrđenih iz proporcionalnih veličina radioaktivnosti frakcija u sukcesivnim periodima), vidi se da je koncentracija svake frakcije proporcionalna umnošku kvadrata apsolutne količine prenošenja fosfora u jedinici vremena (2 h) sa količinom  $K^S/K^R$ , (Pogledaj tablicu br. 4, II dela, kolona 5). Iz formule izlazi da bi koncentracije frakcija bile proporcionalne samo njihovom razlomku  $K^S/K^R$ , ako bi sve frakcije imale istu apsolutnu veličinu transporta. U tom bi slučaju neorganska frakcija imala najmanju koncentraciju, jer je njen razlomak  $K^S/K^R$ , najmanji. U stvari koncentracija neorganske frakcije ipak je veća od svih organskih iz acidsolubilne grupe frakcija, jer neorganska frakcija ima neuporedivo veći transport. Nukleoproteidi bi morali imati 1840 puta veću koncentraciju, pošto je njihov količnik specifičnih brzina za toliko puta veći nego u neorganskoj frakciji. U stvarnosti pak koncentracija nukleoproteida svega za 2,85 puta premašuje koncentraciju neorganske frakcije. Ovako mala razlika između koncentracija ovih dveju frakcija, nastala je usled toga što je transport fosfora u neorganskoj frakciji oko 26,3 puta veći od transporta u nukleoproteidima. Kako je koncentracija proporcionalna ne jednostavnogm apsolutnom transportu, već kvadratu transporta, jasno je da transport deluje na formiranje koncentracije u neorganskoj frakciji oko 660 puta intenzivnije nego u nukleoproteidima. Zanimljivo je uporediti veličinu koncentracije frakcije stabilnog fosfora iz ATP-a sa koncentracijom u fosfolipoidima, pošto su im apsolutni transporti skoro identični (u stabilnoj frakciji veći je transport svega za 1,035 puta od onoga u fosfolipoidima). To nam pruža zgodnu priliku da proverimo gornje postavke. Ako se koncentracija fosfora u stabilnoj frakciji ATP-a ili u fosfolipoidima iskoriguje da odgovara razlici kvadrata transporta, tada bi te dve koncentracije morale biti proporcionalne razlomcima svojih specifičnih brzina (sinteze i razlaganja). Kako je kvadrat transporta stabilne frakcije veći od kvadrata transporta u frakciji fosfolipoida za 1,072 puta, mora se ili koncentracija fosfolipoida pomnožiti, ili stabilna frakcija podeliti sa tom cifrom. Ako pomnožimo

koncentraciju fosfolipoida (85) sa tim brojem, dobićemo  $=85 \times 1,072 = 91,2$ . Dakle proporcija koncentracije biće:  $91,2 : 3,36 = 27,15$ , dok će proporcija razlomaka  $K^S/K^R$ , iznositi:  $1,53 : 0,0554 = 27,6$ . Vidimo dakle da i ova kontrola pokazuje dobro slaganje između koncentracije i razlomaka specifičnih brzina (pod uslovima jednakih transporta dveju frakcija), što znači da je jednačina za koncentraciju ( $C = K^S/K^R \cdot Ap^2$ ) još jednom položila ispit sa uspehom.

Iz formule za koncentraciju izlazi takode i jedan drugi direktni zaključak, da se koncentracije dveju posebnih frakcija moraju odnositi jedna prema drugoj u proporciji kvadrata njihovih apsolutnih količina transporta, u koliko im se izjednače specifične brzine sinteza i razlaganja (odnosno ako im se izjednače razlomci  $K^S/K^R$  bez izjednačenja samih specifičnih brzina). U krajnjoj liniji to bi moralo značiti da pod tim uslovima eksperimentalno izmerene koncentracije frakcija nužno moraju biti proporcionalne samo kvadratima svojih eksperimentalno utvrđenih transporta.

I za ovo upoređenje veoma su zanimljivi fosfolipoidi, jer imaju proporciju između specifične brzine sinteze i specifične brzine razlaganja skoro istovetnu sa proporcijom tih brzina u frakciji kofermenata  $K^S/K^R$ . Nažalost naši su nam eksperimenti ovakvu komparaciju omogućili samo za te dve frakcije.

U kofermentima razlomak  $K^S/K^R$  iznosi  $= 1,493$ , dok je u frakciji fosfolipoida ove proporcija ravna  $= 1,53$ , tj. samo za 2,5% veća nego u kofermentima. Kako je ekvivalent transporta u fosfolipoidima oko 6 puta veći nego u kofermentima, morala bi i njihova koncentracija biti veća od one u kofermentima za  $6^2 = 36$ . Dakle ako koncentraciju fosfolipoida (85) podelimo sa koncentracijom kofermenata (2,33), dobićemo:  $85,5 : 2,33 = 36,5$ . Prema tome rezultati se veoma dobro podudaraju, jer koncentracija ovih dveju frakcija (zasebno izmerene hemijskom analizom), stoje u istoj međusobnoj proporciji u kojoj se nalaze kvadrati njihovih (odvojeno ustanovljenih) transporta. Namesto ovih približnih vrednosti za koncentracije i transporte, u tablici br. 3, kolone 6 i 7 se nalaze sasvim tačne cifre, i tamo se vidi sasvim dobro podudaranje između proporcija koncentracija i kvadrata transporta ovih dviju frakcija sa skoro jednakim razlomcima za  $K^S/K^R$ .

Oba poslednja računa nesumnjivo su potvrdila da su naše eksperimentalne osnove za specifične brzine sinteza i razlaganja, kao i jednačine za njihova izračunavanja tačne. Na međufrakcijskom planu dokazana je i tačnost jednačine za izračunavanje koncentracija iz količina transporta, veličina specifičnih brzina sinteza i razlaganja. Pošto zasada ne vidimo drugu vezu između frakcija izuzev transporta fosfora, čini nam se da smo dužni zaključiti da podudarnost biva ostvarena na međufrakcijskom planu baš putem transporta. Da jednačina za koncentraciju važi na planu jedne iste frakcije, mislimo da smo dokazali već u II delu ove publikacije (vidi tablicu br. 4 kolona 4 saopštenja pod 18).

Možda bi se moglo pomisliti da ova dva upoređenja čine izuzetak u našim eksperimentalnim nalazima, usled toga što je priroda samih

frakcija ponudila mogućnost upoređivanja, dok se u ostalim frakcijama slične podudarnosti ne bi mogle pokazati. Mada nam priroda nije bila naklonjena u pogledu pogodnosti za upoređivanja proporcija između transporata i koncentracija na bazi jednakosti razlomaka  $K^S/K^R$  smatramo da bi ipak bilo važno proveriti na svim frakcijama ispravnost naših formula, i verodostojnost naših analiza. Ako nam priroda frakcija nije pružila mogućnost neposrednog upoređivanja tih odnosa, to nam omogućuje matematika: računskim putem moguće je međusobno izjednačiti razlomke  $K^S/K^R$  svih frakcija, a koncentracije korigovati u odgovarajućim proporcijama. U tom slučaju korigovane vrednosti za koncentracije frakcija morale bi takođe biti ravne kvadratima svojih transporata.

Kako smo u prvom poglavlju ovog rada za izračunavanje ekvivalenata transporta već upotrebili transport kofermenata, smatrali smo za pogodno da njihov razlomak  $K^S/K^R$  iskoristimo kao bazu na kojoj će se izjednačiti razlomci svih frakcija. U tu svrhu smo razlomke specifičnih  $K^S/K^R$  pojedinih frakcija podelili sa tim razlomkom za kofermente (1,493). Sa dobivenim brojem za jednu frakciju podeljena je vrednost njene koncentracije, jer je ta vrednost u jetri formirana na bazi postojećeg transporta i postojećeg razlomka te frakcije. U uslovima drugog razlomka za  $K^S/K^R$  isti transport frakcije formirao bi sasvim drugu koncentraciju, saglasno novom razlomku. Izračunate (korigovane) koncentracije frakcija realno bi morale postojati pod uslovima izjednačenih razlomaka  $K^S/K^R$ . Veličine faktora za korekturu razlomaka  $K^S/K^R$  i koncentracija frakcija ispisane su pod kolonom 3 tablice br. 3. Radi upoređenja date su paralelno stvarne i korigovane koncentracije frakcija (vidi kolone 4 i 5 tablice br. 3). Da bi i koncentracije mogle biti iskazane u ekvivalentima na istoj osnovi na kojoj i transporti, korigovane vrednosti za koncentracije svih frakcija podeljene su sa vrednošću koncentracije za kofermente, koja je uzeta kao jedinica (tj. podeljena je sama sa sobom). U koloni 6 tablice br. 3 ispisane su ove ekvivalentne veličine za koncentracije frakcija. To omogućuje da koncentracije frakcija budu upoređene sa kvadratima ekvivalenata svojih (apsolutnih) transporata za period obnavljanja jednog ciklusa celog lanca fosfornog metabolizma u jetri pacova (tj. za period od 1845 minuta). Sami kvadrati ekvivalenata apsolutnih transporata frakcija izneti su u koloni 7 iste tablice, neposredno uz vrednosti ekvivalenata i korigovanih koncentracija. U kolonu 8 prenete su originalne veličine ekvivalenata apsolutnih transporata (iz tablice br. 1, kolona 7) izračunatih za ciklus obnavljanja celoga lanca.

Prethodni proračuni izvedeni su u svrhu upoređivanja na principu ekvivalenata celog lanca, pri čemu je kao osnova uzeta frakcija kofermenata, odnosno njihov transport i njihov razlomak  $K^S/K^R$ . Pored prednosti za upoređenje koncentracija sa kvadratima transporata na

Tablica br. 3

Naziv frakcije	Vrednosti K <sup>s</sup> /K <sup>R</sup>		Apsolutne veličine koncentracija		Ekvivalentne veličine transporta		K <sup>s</sup> /K <sup>R</sup> = 1		Formiranje koncentracije u transportnom lancu		
	Orig- nalna vrednost	Faktor za ko- rekciju koncen- tracije na osnovu izjedna- ženih K <sup>s</sup> /K <sup>R</sup> na vrednost = 1,493	Orig- nalna aps- olutna vrednost	Korigo- vana vrednost pomoću faktora za izje- dnačenje K <sup>s</sup> /K <sup>R</sup> na nivo = 1,493	Ekviva- lentni aps- olutni koncen- tracija iz: Korigo- vana koncen- tracija Kong. kofe- menata	Ap <sup>1</sup>	Ap	$1 \times A^2 = C$	$V = \frac{1}{A} \times C$	Učestoće kolititnaka K <sup>s</sup> /K <sup>R</sup> u %	Učestoće kvadrata trans- porta (Ap <sup>2</sup> ) u %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Neorganski P	0,00176	0,001170	25,69	21,600,—	9,390,—	0,400,—	38,—	14,600,—	122,0	0,0067	99,9933
P iz grupe sekura	0,0131	0,00878	0,36	034,—	363,—	420,—	20,5	658,—	25,65	0,152	99,848
Labilni P iz ATP-a	0,0212	0,01427	5,93	393,—	163,5	154,—	12,4	256,5	16,—	0,34	99,66
Stabilni P iz ATP-a	0,0554	0,0371	3,36	90,5	38,7	37,7	6,17	60,6	7,79	1,85	98,15
P iz adenilne kiseljine	0,875	0,585	2,32	3,95	1,70	1,72	1,31	2,65	1,628	12,4	87,60
P iz kofemenata	1,493	1,—	2,33	2,33	1,—	1,—	1,—	1,56	1,25	33,1	66,9
P iz nukleoproteida	3,16	2,11	73,3	34,7	14,87	14,45	3,8	23,25	4,82	68,3	31,7
P iz fosfolipida	1,53	1,025	85,—	93,—	35,6	35,4	5,96	53,6	7,46	34,8	65,2

osnovi obnavljanja celog lanca, ovaj postupak ima jednu nezgodnu stranu, što razlomak  $K^S/K^R$  u kofermentima nema vrednost jedinice, već je ravan = 1,493. Na nesreću ni jedna druga frakcija nema vrednost ravnu tačno jedinici. Najbliža vrednost jedinici za  $K^S/K^R$  nalazi se u frakciji adenilne kiseline, gde iznosi = 0,8767, (znači da je za oko 12% manja od jedinice). Prema tome moraćemo preračunati sve razlomke  $K^S/K^R$  bez oslonca na realnu vrednost neke od frakcija. To ćemo nabrže ostvariti ako veličine korigovanih koncentracija iz kolone 5 tablice br. 3 podelimo sa vrednošću razlomka  $K^S/K^R$  koji nam je poslužio kao osnova za ekvivalenciju, tj. sa 1,493 (iz frakcije kofermenata). Ovako preračunate vrednosti za koncentracije frakcija unete su u kolonu 9 tablice br. 3. One imaju tu odliku u odnosu na cifre iz kolona 5 i 6 da su zasnovane ne samo na izjednačenim vrednostima proporcija između specifičnih brzina sinteza i specifičnih brzina razlaganja, već su ti razlomci istovremeno svi ravni jedinici. To znači da se upoređenje vrši na pretpostavci da je u svakoj frakciji specifična brzina sinteze izravnata sa specifičnom brzinom razlaganja. U tom slučaju jednačina za koncentraciju postaje sasvim uprošćena, jer vrednost  $K^S/K^R = 1$  automatski ispada, te ostaje da je koncentracija ravna samom kvadratu transporta, tj.  $C = Ap^2 \cdot 1$ .

U koloni 10 ispisane su vrednosti kvadratnih korenova izvučenih iz cifara kolone 9 tablice br. 3. Ni ove koncentracije nisu mogle biti ustanovljene u organizmu, jer su preračunate za pretpostavku jednakosti specifičnih brzina sinteza i razlaganja unutar svake frakcije, što u organizmu nije ostvareno baš ni za jednu frakciju.

Kolona 9 pružila nam je mogućnost jedne nove analize sasvim očiglednih odnosa. Naime u toj koloni koncentracije se formiraju tako da sinteza i razlaganje deluju sa jedinicom, dok kvadrat transporta sa odgovarajućom vrednošću za svaku frakciju. To omogućuje izračunavanje procentnog učešća tih dveju veličina u formiranju koncentracije pojedine frakcije. Procenat učešća sinteze i razlaganja (odnosno njihovog razlomka  $K^S/K^R$ ) iznet je u koloni 11, a procenat učešća kvadrata transporta u koloni 12 tablice br. 3.

Bili smo vrlo prijatno iznenađeni kada smo ustanovili da su korigovane koncentracije (kako one koje su izračunate na jednakosti razlomaka  $K^S/K^R$  sa = 1,493, tako i one koje imaju kao osnovu jednakost toga razlomka sa jedinicom — vidi kolone 5 i 6 i kolonu 9 tablice br. 3) većine frakcija skoro identične sa kvadratima sopstvenih transporta.

Ova činjenica nije zavisna od nivoa izjednačenja razlomaka  $K^S/K^R$  pa prema tome važi i za stvarno postojeće vrednosti za specifične brzine sinteza i razlaganja. Sistem ovog načina iskazivanja ima prednost što gornje relacije čini sasvim očiglednim.

Zanimljivo je da smo najveći stepen podudarnosti između veličina korigovanih koncentracija i kvadrata transporta ustanovili u onim frakcijama čije smo veličine transporta i koncentracija sami ustanovili uporednim analizama, dok u frakcijama za koje smo transporte izračunavali iz tuđih eksperimenata odstupanja su veća, a u grupi šećera

čak postoji upadljivo neslaganja između koncentracije i kvadrata transporta (izračunatog pomoću modifikovane jednačine Guldborg-Wage-ovog zakona iz aproksimativno procenjene koncentracije šećera u jetri pacova). Izuzetno od ovih slučajeva u neorganskoj frakciji podudaranje između analizovane koncentracije i izračunatog transporta (iz tuđih analiza) je idealno. Odstupanja u grupi šećera pokazuju da naša procena koncentracije šećera u jetri nije bila sasvim tačna, a ni izračunavanje pomoću adaptiranih Guldborg-Waage-ovih jednačina nismo imali prilike da proverimo merenjem radioaktivnosti u periodu porasta. Čini nam se da ipak možemo biti zadovoljni što odstupanja ne premašuju iznos od 11,57% kod upotrebe tako zaobilaznog puta i nedovoljno pouzdane osnove za izračunavanje transporta. Previsok nivo transporta pokazao se već kod pokušaja rekonstrukcije reakcionog poretka. Tada smo smatrali da to potiče od upotrebe fosfora iz šećera možda za procese izvan lanca (napr. za sintezu ili razlaganje glikogena u funkciji regulacije krvnog šećera). Karakteristično je za tablicu br. 3 da koncentracije upoređuje sa transportima na osnovu lančastog procesa, ne obuhvatajući i ona vezivanja fosfora za grupu šećera koja ne prelaze u lanac. Da i u toj činjenici može biti razlog neslaganja između veličine koncentracije fosfora i njegovog transporta u grupi šećernih frakcija, pokazuje i sledeći podatak. Naime neslaganje od 11,57% smanjuje se na svega 5%, ako za upoređenje ne koristimo sav transport fosforne šećerne grupe, već samo onaj deo koji faktički biva primljen od sledećih frakcija našeg lanca. Kako su labilna i stabilna frakcija ATP-a jedini neposredni primaoci fosfora iz grupe šećera, onda zbir njihovih ekvivalenata ( $13 + 6,5 = 19,5$ ) mora predstavljati količinu koju šećeri faktički unose u lanac. Pošto je  $19,5^2 = 380$ , a korigovana koncentracija za šećere u koloni 6 iznosi  $= 363$ , vidimo da neslaganje neznatno premašuje odstupanja u frakciji stabilnog fosfora (2,6%), odnosno da je čak manje nego u frakciji labilnog fosfora iz ATP-a (6,5%), za koji smo transport izračunali iz vremena obnavljanja utvrđenog od strane Rappoport-a. Prema tome možemo u celini uzeti da se i transporti, za čije smo izračunavanje upotrebili izvore iz radova drugih autora, dobro podudaraju sa vrednostima za korigovane koncentracije, čije smo originalne (nekorigovane) iznose ustanovili u našim sopstvenim analizama pomoću dveju tehnika (kolorimetrijskom za obični i merenjem radioaktivnosti u periodu zasićenosti frakcija radiofosforom).

Ne želimo isključiti ni mogućnost pogreške pri kalkulaciji transporta za grupu šećera. Međutim smatramo da i u granicama ustanovljenih nepodudarnosti nećemo pogrešiti ako zaključimo, da su poklapanja (uprkos svim neslaganjima) još uvek ipak tako upadljiva da potvrđuju kako teorijsku vrednost naših jednačina (koje smo primenili iz jedne naše ranije publikacije — odnosno iz II dela ove publikacije — (vidi navod literature br. 14), tako i analitičku pouzdanost podataka za koncentraciju, odnosno za transport, (čak i u slučajevima gde smo koristili tude nalaze za izračunavanje veličine transporta).

Možda bi na ovom mestu trebalo raspraviti jedan specijalni problem. Postavlja se pitanje da li podudaranje cifara u našim računima ne proizlazi iz primenjenog računskog sistema, odnosno iz upotrebljenih jednačina, koje sopstvenom procedurom stvaraju prividni krug

uzročnosti? To bi moglo već samo po sebi — automatski — dovoditi do podudaranja izračunatih vrednosti! Proanalaziraćemo malo odnose i računski metod.

Svi izvorni podaci za izračunavanje reakcionih konstanti dobiveni su posebnim merenjima za svaku frakciju i svaku vrstu činjenica. Koncentracije su ustanovljene kolorimetrijom i merenjem radioaktivnosti u periodu ravnoteže radioaktivnosti (tj. posle 48 h). Transporti za četiri frakcije ustanovljeni su iz porasta radioaktivnosti (u periodu njenog uspona — dakle pre nego što je došlo do ravnoteže). Za tri frakcije vremena obnavljanja upotrebljena su iz literature. Za grupu šećera transport je izračunat na sasvim treći način, što je sve opisano u II delu ove publikacije. Koncentracije fosfora uopšte nisu sporne, jer je u I delu pokazano da se kolorimetrijske analize podudaraju sa radioaktivnim, kada se uporede na procentnoj bazi, a obe vrednosti se podudaraju sa nalazima J. Sachs-a, ako se organske frakcije upoređuju na bazi ekvivalentnosti fosfora iz šećerne grupe frakcija.

Za izračunavanje veličine transporta koristili smo tri posebno izmerene veličine: 1) stepen početnog zasićavanja radioaktivnosti frakcije u jedinici vremena; 2) punu zasićenost radioaktivnosti u periodu ravnoteže; 3) vreme zasićavanja radioaktivnosti do punog iznosa. Iz naših analiza izlazi da su ove tri veličine funkcionalno vezane i međusobno uslovljene, u slučaju da se transport u jedinici vremena ne menja. Jednačina njihove uslovljenosti glasi:

$$1) \quad T_0 \cdot O = C$$

pri čemu simboli znače sledeće vrednosti:

$T_0$  = vreme zasićavanja (odnosno obnavljanja) radiofosfora.

$O$  = procenat porasta radioaktivnosti (stepen zasićavanja) u jedinici vremena.

$C$  = puna zasićenost radioaktivnosti, koja je proporcionalna veličini koncentracije običnog fosfora za pojedinu frakciju. »Puna zasićenost« radioaktivnosti za radiofosfor ima vrednost analognu sa »koncentracijom« za obični fosfor.

Računsko »kruženje« veličina unutar ove jednačine uslovljeno je samim materijalnim procesima tokom određenog vremena, pošto su za svaku frakciju tri vrednosti iz ove jednačine funkcionalno vezane među sobom u čvrst proces. Ako se ma koja izmeni, nužno se u proporciji jednačine moraju izmeniti i one druge dve veličine. Mislimo da je slučaj izračunavanja transporta za grupu šećera pomoću zakona o delovanju aktivnih masa (naša modifikovana jednačina) veoma instruktivan, jer potvrđuje da su transporti (vrednosti za 0) izračunati iz radioaktivnosti, podudarni sa transportom šećera, mada je izračunat sasvim drugom procedurom. S obzirom na problematiku koju određujemo, koncentracija fosfora i njegov transport u svakoj frakciji su polazne eksperimentalne činjenice iz kojih su izvedeni svi obračuni ostalih reakcionarnih konstanti, koje se neposredno ne mogu ustanoviti putem eksperimenata, već se moraju izračunati pomoću jednačina.

Same jednačine za specifičnu brzinu sinteze i za specifičnu brzinu razlaganja, kao i formula za izračunavanje koncentracija iz porasta radioaktivnosti, izvedene su iz tih dveju eksperimentalnih činjenica upotrebom Guldberg-Waage-ovog zakona o delovanju aktivnih masa za izražavanje ravnoteže proticanja fosfora preko lančastih reakcionih nizova irever-

zibilnog metabolizma (14). Jednačine prikazuju odnose između transporta na ulaznom procesu koji obezbeđuje sintezu frakcije i koncentracije kao određujućeg faktora za razlaganje, čime se obezbeđuje produženje transporta, posredstvom same frakcije. Ova četiri procesa čine neraskidivi sukcesivni niz koji se neprekidno iznova formira, a ujedno i stalno rastura koncentraciju frakcije u njen transport, te su uvek u uzročnoj, odnosno funkcionalnoj povezanosti i kvantitativnoj proporcionalnosti (dok se proces nalazi u ravnoteži). U ravnoteži jednačine slikaju konstantni odnos između ovih veličina, te odražavaju na računskom planu »kruženje« u tolikoj meri u kojoj je ono prisutno u samom procesu frakcije, odnosno u međufrakcijskim korelacijama.

Dok bi se možda za pojedine procese u jednoj jedinoj frakciji moglo i pomišljati na mogućnost »kruženja«, jer se u jednačini povezuju posebni procesi iste frakcije, dotle takva mogućnost za međufrakcijske odnose a priori otpada, jer u jednačinama nikada nisu obuhvaćeni nikakvi podaci (tj. eksperimentalne činjenice) iz drugih frakcija, već samo iz sopstvene. U koliko postoje podudaranja između koncentracija i transporta raznih frakcija, one su uvek zasnovane na upoređivanju posebno utvrđenih činjenica putem odvojenih eksperimenata! To je znači uvek izvan dometa naših jednačina i nezavisno od njih, prema tome i od računskog kruženja, ako bi bilo uslovljeno jednačinama!

Jednačina za koncentraciju ukazuje da se na osnovu transporta, pod pogodnim uslovima, mogu upoređivati i veličine koncentracija raznih frakcija, uprkos činjenici da su i transporti i koncentracije izmereni putem posebnih i odvojenih analitičkih postupaka. Ako jednačina pretpostavi da veličine koncentracije i transporta za jednu frakciju imaju određenu proporciju prema tim veličinama u drugoj frakciji, onda računsko »kruženje« ostaje nemoćno. U lančastom sistemu vezu među frakcijama ostvaruje transport. Kako je za svaku frakciju veličina njenog transporta ustanovljena iz posebnih merenja radioaktivnosti (u periodu porasta) u njoj samoj, a za šećere čak i sasvim drugim analitičkim putem, proporcionalnosti među frakcijama moraju biti dirigovane tipom ostvarenja transporta u sopstvenoj frakciji, ali su saglasne i prenosu duž celog metaboličnog lanca. Možda bi bilo nužno i za međufrakcijske zakonitosti ustanoviti odgovarajuću jednačinu, jer se zasada ta zakonitost može ustanoviti samo indirektnim putem, na osnovu upoređivanja činjenica iz jednačina za posebne članove lanca. Međutim za taj zadatak još nemamo dovoljno podataka (svakako ni iskustva!), te zasada ne možemo čak ni približno sagledati eventualni izgled takve jednačine.

Ako posebne jednačine otkriju neko »kruženje« i međuzavisnost činjenica iz raznih frakcija, onda je to posledica već završenog procesa, koji su naše intervencije i analize zatekle i prekinule u različitim stepenima njegovog razvitka. Naši rezultati samo slikaju ono što se zbilo na međufrakcijskom planu i u pojedinim frakcijama. Prema tome ako su naše analize i jednačine sposobne da otkriju međufrakcijska »kruženja« i odnose, onda treba da ih prihvatimo kao pouzdano pomagalo za analizu lanca.

Upoređujući podatke izložene u kolonama tablice br. 3 otkrili smo više iznenadujućih rezultata. Najpre nismo mogli predvideti da li će koncentracije svih frakcija pod jednakim uslovima sinteza i razlaganja dosledno slediti formulu za koncentraciju. Nismo mogli dalje zamisliti

da li će koncentracije biti identične sa kvadratima transporata svojih frakcija, nezavisno od nivoa izjednačenja razlomaka njihovih specifičnih brzina. Treća stvar, koja nas je iznenadila, odnosi se na strogu proporcionalnost među veličinama koncentracija i transporata frakcija pri jednakim vrednostima za njihove razlomke  $K^S/K^R$ . Neočekivana je bila i činjenica da kod izjednačenosti vrednosti  $K^S/K^R$  na jedinici, koncentracije bivaju izjednačene sa kvadratima transporta u jedinici vremena (tj. prema našem kriterijumu 2 h, vidi II deo ovog rada). Veoma nas je iznenadila činjenica da jednačina dozvoljava korigovanje koncentracije preko faktički postojećeg transportnog kapaciteta, koji ni pod kakvim uslovima ne bi koncentraciju mogao stvoriti! Tako napr. koncentracija za neorgansku frakciju iz kolone 5 premašila bi transport koji se ostvaruje tokom jednog ciklusa lanca za 11,6 puta, ako bi obnavljanje teklo brže od izlaženja za 1,493 puta. Transport bi bio premašen za 7,8 puta ako bi ulaženje moglo teći istom brzinom kojom izlaženje. Najveće su nam iznenađenje ipak priredile kolone 11 i 12 iste tablice. Neposredno iz formule ne bi se stekao utisak da transport ima tako veliko kvantitativno učešće u formiranju koncentracije u tekućem lancu metabolizma. Transport napr. u neorganskoj frakciji učestvuje u formiranju koncentracije sa 99,9933%, dok je uloga količnika  $K^S/K^R$  zanemarujući malena (hiljaditi delovi od jednog procenta). Ovo u nešto blažoj meri važi i za sledeće tri frakcije (ispod neorganske) u toj koloni. Čak i u frakciji u kojoj sinteza za 316% teče brže od razlaganja (tj. u nukleoproteidima), transport još uvek učestvuje sa 31,7% u formiranju koncentracije sopstvene frakcije. Najzad iznenađujuća je bila i činjenica da, izuzev tri frakcije, cifarsko podudaranje vrednosti za koncentracije sa vrednostima za kvadrate transporta leži u vrlo uskim granicama eksperimentalnih grešaka. Čak i opisana odstupanja za slučajevne korišćenja tuđih izvora za izračunavanje transporta nisu prešla dozvoljene granice.

Prekomerna vrednost korigovanih veličina za koncentracije pri izjednačenim vrednostima razlomka  $K^S/K^R$  (kakve bi nužno morale nastati kada bi u jetri postojala mogućnost za izjednačenje tih količnika za sve frakcije), pokazuje da, ono što smo mi računski izveli, organizam nikada ne bi mogao učiniti, tj. da pri postojećim veličinama transporta frakcija izjednači njihove količnike  $K^S/K^R$ . Za naš konkretni zadatak to i nije bitno, jer u granicama postojećih specifičnih brzina ne samo transport već i formiranje njihovih koncentracija biva po pravilima, kao da je i takav slučaj mogućan. Za nas je bilo osnovno utvrditi tačnost naših formula za specifične brzine i za njihove konkretne veličine, kao i ispravnost formule za izračunavanje koncentracije iz dinamičnih reakcionih konstanti metabolizma radiofosfora. Račun je u suštini potvrdio s jedne strane naše teze i naše formule, a s druge strane i konkretne veličine naših reakcionih konstanti. Neposredno je dokazano na primerima drugih frakcija čije bi korigovane koncentracije mogle stvarno biti formirane iz postojećeg transporta, da principi opisani u ovom radu imaju realnu podlogu. One ipak važe i u slučajevima u kojima to nepo-

sredno nije uočljivo. To se može zaključiti iz činjenice da je korekcija koncentracije postignuta deljenjem vrednosti faktične koncentracije pomoću istog broja, pomoću koga je postignuto izjednačenje razlomaka  $K^S/K^R$  za pojedine frakcije. To znači da izvršenim računskim operacijama nismo dirali postojeće proporcije koncentracija i transporta, već smo ih samo preveli u lako uporedive veličine, odnosno omogućili im da neposrednije iskažu određene pravilnosti na kojima su zasnovani odnosi sinteza, razlaganja, transporta i koncentracija u lančastom sistemu metabolizma fosfora.

Izgleda nam da je moguće naći donju granicu vrednosti za  $K^S/K^R$  pri kojoj bi koncentracija još realno mogla biti stvorena. Za to nam daje priliku frakcija stabilnog fosfora, čiji razlomak  $K^S/K^R = 0,0554$ , pomnožen sa kvadratom transporta ( $7,74^2 = 59,0$ ) daje koncentraciju 3,36 mg. Međutim ako se razlomak  $K^S/K^R$  za tu frakciju povisi na vrednost za kofermente što je učinjeno u koloni 5 tablice br. 3), tada koncentracija poraste na 90,5, što je još uvek za 28,5 mg (vidi kolonu 6, tablice br. 1) ispod apsolutnog transporta za vreme trajanja jednog ciklusa obnavljanja lanca (1845 minuta). Donja granica vrednosti razlomka  $K^S/K^R$  za realnu korekciju koncentracije pri izjednačenim vrednostima tih razlomaka na nivou razlomka kofermenata mora biti oko 0,045. Nemamo nikakvih eksperimenata za zaključak o tome da li je u živom organizmu moguća izmena specifičnih brzina reakcije, pa prema tome ni o tome da li ovi naši računi mogu biti realizovani u samom metabolizmu!

Upadljivo je da čeona frakcija (neorganska) u procesima lanca najviše učestvuje svojim transportom, a najmanje razlomkom  $K^S/K^R$ . Istovremeno frakcije sa repa lanca (nukleoproteidi i kofermenti, delom i adenilna kiselina, kao i frakcija fosfolipoida koja inače zauzima posebno završno mesto u bočnom repu lanca) imaju uvek visoke vrednosti za  $K^S/K^R$  dok su im ekvivalentni transporti uvek maleni.

Frakcije, čiji transport relativno manje učestvuje u formiranju sopstvene koncentracije, održavaju znatno veću stabilnost svojih koncentracija, jer je zavisnost od kvadrata transporta stalno u velikoj meri

korigovana pozitivnim doprinosom razlomka  $K^S/K^R$  (u korist koncentracije: napr. kod nukleoproteida, a u izvesnoj meri i kod fosfolipoida, kao i kod kofermenata, mada ovde manje, jer transport kod ovih dveju frakcija još uvek učestvuje sa 2/3 u stvaranju koncentracije), Naprotiv u frakcijama u kojima je transport skoro isključiva količina za obrazovanje koncentracije (napr. neorganski P ili P iz šećerne grupe), ova je izložena nesrazmerno većim kvantitativnim kolebanjima pri izmeni brzine transporta.

Gore smo videli kako se principijelno formira koncentracija i u kojoj srazmeri zavisi od veličine transporta, odnosno od proporcija ulaženja prema izlaženju fosfora. U svim tim razmatranjima posmatrali smo kako to izgleda kada je koncentracija već dostigla svoju punu

vrednost, tj. kada prođe period obnavljanja fosfora frakcije. Međutim iz tih razlaganja nije jasno kakve su veze između koncentracije i transporta za vreme dok se koncentracija tek formira u frakciji, kada još ne postoji ravnoteža transporta. Da bismo to pitanje bolje sagledali i našli odgovor na njega, načinili smo tablicu br. 4, u kojoj su izračunate veličine izlaza radiofosfora za periode u kojima se tek formira veličina njihove koncentracije, a saglasno formuli za brzinu razlaganja. Kako prema tablici br. 2 ulaženje fosfora u neorgansku frakciju od početka mora bivati istom proporcijom kao i posle ravnoteže, to je i u tablici br. 4 iskazano u koloni br. 1. U koloni 2 iste tablice ispisane su sukcesivne veličine koncentracija kako postepeno (po dekadama) formiraju ravnotežne koncentracije. Počeli smo sa milijonitim delom koncentracije, da bismo videli koliki deo izade pri toj početnoj koncentraciji. Odmah se vidi da kod milijonitog dela od završne veličine koncentracije izlazni transport iznosi  $1/1000 = \sqrt[3]{10^{-6}}$  od ulazne veličine. U sledećoj dekadi koncentracija će porasti na 10 puta veću vrednost, dok će istovremeno izlazni transport porasti za svega kvadratni koren od 10 (tj. 3,18 puta). Na taj način će svaki porast koncentracije za jednu dekadu dovesti do povećanja izlaznog transporta za svega kvadratni koren od 10. Najzad

Tablica br. 4

Brzina ulaženja za period od 120 min.	Koncentracija		Brzina iz loženja za 120 min.	
	Apsolutne količine	Proporcije formiranja	Proporcije porasta	Apsolutne veličine
1	2	3	4	5
120,0	0,00002569	$C = C_0 \times 10^{-6}$	$A_p = A_{p_0} \times \sqrt[3]{10^{-6}}$	0,1210
120,0	0,0002569	$C = C_0 \times 10^{-5}$	$A_p = A_{p_0} \times \sqrt[3]{10^{-5}}$	0,3860
120,0	0,002569	$C = C_0 \times 10^{-4}$	$A_p = A_{p_0} \times \sqrt[3]{10^{-4}}$	1,210
120,0	0,02569	$C = C_0 \times 10^{-3}$	$A_p = A_{p_0} \times \sqrt[3]{10^{-3}}$	3,860
120,0	0,2569	$C = C_0 \times 10^{-2}$	$A_p = A_{p_0} \times \sqrt[3]{10^{-2}}$	12,210
120,0	2,569	$C = C_0 \times 10^{-1}$	$A_p = A_{p_0} \times \sqrt[3]{10^{-1}}$	38,60
120,0	25,69	$C = C_0 \times 10^0$	$A_p = A_{p_0} \times \sqrt[3]{10^0}$	121,0

kada početna koncentracija poraste milion puta, te dostigne svoju završnu ravnotežnu veličinu tj. punu vrednost C, izlazni će se transport izravnati sa ulaznim, porastavši od svoje početne vrednosti za kvadratni koren od milion, tj. povećanje transporta prema početnom iznosi svega

za 1.000 puta. Iz ovog jasno sledi da se koncentracija frakcije formira brže od stvaranja izlaznog transporta. Povećanje izlaznog transporta proporcionalno je samo kvadratnom korenu postignute koncentracije. Ovaj odnos pokazuje da koncentracija frakcije mora najpre porasti za kvadrat, da bi izlaz porastao samo za kvadratni koren. Videli smo da

je uopšte pravilo da dve frakcije sa jednakim razlomkom  $K^S/K^R$  formiraju koncentracije proporcionalno kvadratima sopstvenih transporta. Moglo bi se zameriti da se ovde ne radi o dve različite frakcije, niti o transportu uravnotežene frakcije. Prvi prigovor mora otpasti. Najidealnije je kada ista frakcija formira razne koncentracije (a to se događa svaki puta kada unesemo radiofosfor, te on postepeno počinje ulaziti u frakciju gde formira sopstvenu radioaktivnu »koncentraciju«), jer je tada na istoj frakciji moguće proveriti odnos raznih veličina koncentracija prema odgovarajućim transportima. Neobično je što se ovde proporcija ogleda na izlaznoj veličini fosfora. Međutim u koncentraciji koja još nije dostigla svoju maksimalno moguću veličinu izlazni transport, odnosno razlaganje frakcije, proporcionalno je samoj koncentraciji, ali po obrnutom pravilu po kome transport obrazuje koncentraciju svoje frakcije. U tablici br. 2 već se u kolonama 2, 6 i 8 vidi da ulazanje od početka teče punim kapacitetom, dok to nije bio slučaj sa izlaženjem.

Prethodna izlaganja jasno su pokazala da koncentracija nije samo proizvod transporta, već i njegov tvorac za sledeću etapu prenošenja: izlazna brzina iz frakcije u stvari je merilo njenog transportnog kapaciteta. Koncentracija diriguje veličinu izlaznog transporta prema formuli o brzini razlaganja (prema zakonu o delovanju aktivnih masa). Koncentracija je s jedne strane proizvod ulaznog transporta, ali je ona sama tvorac izlaznog transporta. U lančastom metabolizmu ona se nikako ne može ni formirati niti održati bez transporta, jer je ona i sama specifična forma, odnosno posebna manifestacija transporta.

Ostalo je da se razjasni još jedno pitanje u vezi sa transportom kroz metabolični lanac. To je pitanje odnosa vremena prema veličini transporta. Videli smo da su naše specifične brzine i razlaganja izračunate iz brzina obnavljanja frakcije (to znači iz brzine transporta). Međutim kada se radi o transportu, onda moramo potsetiti da je svaki transport funkcionalno zavisano od vremena. Tablica br. 5 prikazuje za šećernu frakciju zavisnost transporta od vremena, kao i uticaj količine transporta na veličine reakcionih konstanti. Već smo u II delu videli da

Tablica br. 5

Vreme transporta u min.	Veličina transporta	$K^S$	$K^R$	$K^S/K^R$	$K^S \cdot K^R$
1	2	3	4	5	6
12	2,565	0,39	0,307	1,27	0,12
120	25,65	0,039	3,07	0,0127	0,12
1200	256,5	0,0039	30,7	0,000127	0,12

je količina transporta direktno proporcionalna vremenu njegovog trajanja (upoređi kolone 1 i 2 ove tablice). Kako je prema našim formulama specifična brzina sinteze ravna recipročnoj vrednosti apsolutne količine transporta, iz gornjeg upoređenja izlazi da bi za svako vreme transporta trebalo imati posebnu specifičnu brzinu sinteze. Iz naše originalne formule ne vidi se zavisnost specifične brzine od vremena trajanja transporta (mada on raste proporcionalno svom trajanju). Dok smo za pojedine frakcije izračunavali reakcione konstante, to nije dolazilo do izražaja, jer smo sve račune izvodili prema brzini obnavljanja frakcije u vreme našeg prvog merenja radioaktivnosti (2 h = 120 minuta). Međutim, kada se pojavi nužnost da specifične brzine određujemo i iz nalaza u drugim vremenima (kao napr. u tablici br. 5) moraćemo najpre ustanoviti koja je od označenih brzina baš specifična. Pošto je specifična brzina sinteze recipročna vrednost apsolutnog transporta, izlazi da će račun u kraćem vremenu, usled manjeg transporta, pokazati veću specifičnu brzinu sinteza i obratno. Ako želimo da dobijemo stvarne specifične brzine od kog bilo transporta, onda recipročnu vrednost datog transporta treba pomnožiti sa brojem jedinica vremena tokom kojega je on izvršen. Dobićemo u tom slučaju sledeću formulu za specifičnu brzinu sinteze:

$$K^S = \frac{t}{A_p t}$$

Dakle specifična brzina sinteza ravna je recipročnoj vrednosti transporta u ma kom vremenu, pomnoženoj sa brojem vremenskih jedinica u kojima je transport realno izmeren (u nas je jedinica vremena za konstante = 2 h).

I u formiranju specifične brzine razlaganja učestvuje transport. Kako tablica br. 5 pokazuje, sa porastom vremena morala bi se povećati specifična brzina razlaganja, ako je ne ograničimo vremenom u kome je izvršen transport. To se nužno mora odraziti i u formuli za specifičnu brzinu razlaganja:

$$K^R = \frac{A_p t}{c x t}$$

Ako je vreme transporta ravno jedinici, onda za obe specifične brzine ostaje ranije predložena formula. Međutim kada je vreme veće ili manje od jedinice, onda treba vrednost transporta korigovati na jedinicu vremena, što je novim predlogom formula obezbeđeno. Specifična brzina razlaganja takođe se može izračunati iz transporta u ma kom vremenu, ako se dobivena vrednost podeli sa brojem jedinica vremena.

Čini nam se da bi formiranje koncentracije u frakciji, kao i njenu ulogu u ostvarenju transporta pomoću koncentracije, najlepše mogli ilustrovati sa jezerom kroz koje protiče reka. Dok je jezero prazno, rečni transport najpre služi samo punjenju jezera. Ako je ulaz širok, a izlaz mali, vodeni kapacitet jezera biće veći: pri tom će uski izlaz propustiti izlaznu količinu vode tek kada nivo površine dostigne veliku visinu. Naprotiv, ako je izlaz širi od ulaza, količina izlazne vode izravnaće se sa ulaznom, pri niskom nivou, koji će biti dostignut mnogo ranije.

\*)  $A_p$

= veličina transporta tokom vremena t.

Kada se postigne ravnoteža punjenja i pražnjenja jezera, tada rečni tok više ne može formirati novi nivo, već sva voda koja uđe kroz ulaz biva propuštena na izlazu. Reka tada samo protiče kroz jezero, a jezero u odnosu na reku vrši samo transport, dok je u početku pretežno vršilo akumulacije rečne vode. Visok nivo vode u jezeru sa uskim ulazom i širokim izlazom može biti formiran samo vrlo velikim transportom.

Slično možemo zamisliti i transport metabolita kroz frakcije: svaka frakcija ličila bi na jezersko proširenje metabolične reke. Kao i rečno jezero i metabolično će najpre koristiti transport da svoj kapacitet napuni do mere potrebne da transport može preko sebe produžiti u nizvodni tok reke. Ako je ulaz u frakciju uzak, onda će pritisak pred ulazom dovesti ipak do velikog transporta u frakciju, te će se u frakciji brzo formirati dovoljan nivo, da kroz široko grlo izlaza protera primljenu količinu. Obrnuto biva ako je ulaz širok, a izlaz uzak. Tada je kapacitet koncentrovanja frakcije velik. Međutim velik kapacitet dovodi do visokog nivoa, pod čijim dejstvom veličina izlaza biva povećana do veličine ulaza. Širina ulaznog grla uslovljavala bi specifičnu brzinu sinteze, dok bi širina izlaznog grla uslovljavala specifičnu brzinu razlaganja. Visok nivo koncentracije frakcije sa uskim ulazom i širokim izlazom (tj. sa malom specifičnom brzinom sinteze i velikom specifičnom brzinom razlaganja) može biti ostvaren samo vrlo velikim transportom.

## OPŠTI ZAKLJUČCI ZA ČETIRI PUBLIKACIJE SA ZAJEDNIČKOM TEMOM

### (O ispitivanju metabolizma fosfora u jetri pacova pomoću radiofosfora)

Pristupajući proučavanju metabolizma fosfora metodom markiranja pomoću radiofosfora, smatrali smo za potrebno da učinimo maksimalan napor da iskoristimo prednosti te metode. Činilo nam se da nam ona omogućuje da se približimo uslovima koji vladaju u organizmu za vreme njegovog života. Umesto da se bavimo samo odvojenim proučavanjima »sastava«, »stanja« ili »struktura« pojedinih hemijskih sastojaka i njihovih posebnih reakcija, želeli smo da pojedinačne analize posebnih supstancija i reakcija organizujemo na takav način i u takvim kombinacijama, da nam omoguće otkrivanje veza među njima, sagledavanje povezanih reakcionih tokova, odnosno elemenata i pokazatelja reakcionog poretka. Odvojeni podaci o posebnim činjenicama u metabolizmu fosfora zanimali su nas samo u meri u kojoj su otkrivali interfrakcijske odnosno intersistemske veze i reakcije. Kako se veze mogu održavati premeštanjem, to nas je posebno zanimalo proces seobe, odnosno transporta fosfora u funkciji povezivanja odvojenih reakcija, kao i zakonitosti takvih sistema.

Da će nas već samo postavljanje takvog zadatka dovesti pred teške probleme tehničkog, metodskog i teorijskog reda, bilo nam je a p r i o r i jasno. Da na tom putu nužno moramo doživjeti mnoge neuspjehe (iz objektivnih razloga, ili zbog sopstvenih pogrešaka), smatrali smo kao neizbježno. Privlačnost ovako postavljenog zadatka izgledala nam je ipak mnogo veća od rizika kome smo se izlagali. Četiri publikacije za

koje sastavljamo zajednički zaključak neka pokažu u kojoj smo se meri prevarili prilikom donošenja odluke za takav istraživački put.

Naša predviđanja (kako u pogledu teškoća, tako i u pogledu omaški) potpuno su se obistinila. Prve teškoće doživeli smo pri pokušaju da u naučnim publikacijama nađemo oslonac i putokaz za naš zadatak. Izuzev u radovima G. Hevesy-a i J. Sachs-a, nismo nigde našli rezultate kompleksno organizovanih analiza metabolizma fosfora u jetri pacova. U glavnom smo se morali orijentisati na saopštenja o ispitivanjima posebnih problema, odnosno pojedinačnih fosforovih jedinjenja, itd. Čak ni pomenuta dva autora, mada su analize izvodili kompleksno, nisu postavljali zadatak da iz te kompleksnosti sagledaju jedinstvo metabolizma fosfora u jetri, niti da ispituju reakcioni poredak toga metabolizma.

Druga teškoća pojavila se na pitanju metodike i eksperimentalne tehnike. Bili smo prisiljeni da uporedo primenjujemo tehnike raznih autora za izdvajanje odgovarajućih grupa frakcija. Napr. za frakcionisanje acidsolubilnih jedinjenja fosfora upotrebili smo tehniku J. Sachs-a, za fosfolipoidne modifikovanu tehniku G. Hevesy-a, a za nukleoproteide dve razne tehnike (Kjeldahl-ovu u početnim analizama, a kasnije žarenje u električnoj peći). Za merenje radioaktivnosti koristili smo Geiger-Müller-ove brojače, a kolorimetrijska merenja izvršili smo tehnikom po Benedict-u (na Pulphrich-ovom fotometru i na Beckmann-ovom spektrofotometru).

Kada smo posle trogodišnjih analiza pokušali sistematizovati rezultate na način koji bi nam omogućio pristupanje rešavanju postavljenog zadatka, došli smo u krizu. Bili smo skoro šokirani, kada smo doživeli neuspeh pri poređenju naših sa Sachs-ovim rezultatima analiza običnog (neradioaktivnog) fosfora u jetri pacova. Dok je između proporcija raspodele običnog i radioaktivnog fosfora u frakcijama postojala potpuna podudarnost u našim analizama, dotle su ove proporcije bile potpuno neuporedive sa Sachs-ovim. Oko šest meseci smo bili potpuno obeshabreni činjenicom da su Sachs-ove vrednosti za organske frakcije po nekoliko puta premašivale naše. Hevesy-ev nalaz, da je količina organski vezanog fosfora određena bogatstvom šećera u hrani pacova pokazao je da razlike između naših i Sachs-ovih rezultata potiču od neadekvatnog načina upoređivanja. Kada smo naše rezultate uporedili sa Sachs-ovim na bazi ekvivalencije fosfora u šećernim frakcijama, dobili smo skoro identične procenete raspodele fosfora u acidsolubilnim frakcijama.

Mada nas je to ohrabrilo (jer smo ustanovili ravnoteže istog reda čak i u rezultatima sasvim različitim od naših), ipak od preglednije deskriptivne sistematizacije materijala nismo mogli dalje krenuti. Pretresli smo ogromnu literaturu, ali tek u Bertalamffy-u (1) i De Groot-u (4) našli smo potstrek, da bi vredelo pokušati rešenje putem primene zakona o delovanju aktivnih masa na lančaste reakcije metabolizma. Ista proporcionalnost raspodele fosfora u jetri pacova upućivala nas je na mogućnost formulacije ravnoteže u smislu Bertalamffy-evog »Fließgleichgewichte« (odnosno na steady state« engleskih autora). Međutim u literaturi nismo našli na mogućnost primene Guldberg-Waage-ovih jednačina za tekuće lance metabolizma. Tek posle dugog lutanja i teškog napora formulisali smo jednačine za ravnoteže u ireverzibilnim lancima metabolizma. Poslije konsultacija hemičara, biohemičara, fiziologa i pret-

hodnog saopštenja na I kongresu fiziologa Jugoslavije u Sarajevu (1956), objavili smo ovu metodsku raspravu. Ona nam je pružila jednačine za specifičnu brzinu sinteze i specifičnu brzinu razlaganja, kao i jednačinu za izračunavanje veličine koncentracije iz podataka o količini transporta i specifičnih brzina. Tako smo došli u posed formule da vrednost koncentracije običnog fosfora izračunamo iz veličine porasta njegove radioaktivnosti.

Za primenu jednačina trebalo je najpre utvrditi veličine transporta za svaku frakciju. Prvo poglavlje našeg saopštenja o reakcionim konstantama metabolizma fosfora u jetri pacova pokazuje na koji smo način taj zadatak izvršili (18).

Ipak za izračunavanje konkretnih specifičnih brzina nismo imali dovoljno eksperimentalnih podataka o veličinama transporta. Svega za četiri frakcije mogli smo transporte izračunati iz naših sopstvenih merenja radioaktivnosti u periodu uspona. Za tri frakcije morali smo koristiti podatke iz literature, mada nismo bili sasvim sigurni da li će se podudarati sa izračunatim iz naših analiza. Kasnije je pomoću jednačine za koncentraciju utvrđeno da odgovaraju veličini stvarne koncentracije (doduše u manjem stepenu od transporta izračunatih u našim analizama). Najteže je bilo izračunati količinu transporta iz šećerne frakcije, jer niko (ni mi, kao ni drugi autori) nije ispitivao veličinu porasta radioaktivnosti u periodu porasta u grupi šećera. Već pomenuti Hevesy-ev nalaz omogućio je pokušaj rešenja ovog pitanja na nov način.

Da za izračunavanje transporta možemo koristiti naše modifikacije Guldborg-Waage-ovih jednačina, setili smo se slučajno. To je moguće samo za čeonu frakciju (tj. za šećer, koji bi prema Hevesy-evom nalazu i našoj pretpostavci mogao stajati na čelu) lanca, koja nastaje iz dve slobodne supstancije, sa definisanim koncentracijama (iz glukoze i neorganskog fosfora). Nažalost ni mi, ni drugi autori (koji su ispitivali fosfor u jetri) nisu uporedo analizovali i količine šećera. Zato smo Magnus-Levy-evu (7) maksimalnu koncentraciju glukoze u jetri (pri bogatoj ishrani šećerom) kombinovali sa minimalnom koncentracijom neorganskog fosfora iz Hevesy-evih analiza (pod analognim uslovima ishrane), i — obratno. Iz približne vrednosti za koncentraciju šećera i poznate za fosfor, izračunali smo verovatnu količinu transporta za šećere. Pomoću jednačine za koncentraciju ustanovili smo da je izračunati fosfor za oko 3,5% veći od stvarnog (tj. pomoću gornje jednačine daje vrednost za koncentraciju veću od stvarne za oko 11%).

Pošto smo na razne načine ustanovili procenete (a zatim i apsolutne) količine za transporte, za sve frakcije smo izračunali specifične brzine sinteza i specifične brzine razlaganja. Kako o pothvatu ove vrste nismo našli nikakve informacije u literaturi, moglo bi se možda uzeti da je ovo izračunavanje specifičnih brzina za sinteze i razlaganja u metaboličnim reakcijama organa *Intra vitam*, tj. u intaktnom živom organizmu, prvi slučaj u biohemiji i fiziologiji.

Sa izračunatim podacima o specifičnim brzinama najpre nismo znali šta da činimo! — Doduše mogli smo ih odmah objaviti kao gole činjenice, jer bi to samo po sebi moglo imati naučnog interesa. Ipak to nismo učinili, jer se nismo mogli zadovoljiti polovičnim rešenjem započetog zadatka. Najpre je trebalo stvoriti kvantitativnu osnovu za iskazivanje transporta sa stanovišta celog lanca. Učinilo nam se logično da će lanac

kao celina biti obnovljen kada njegova frakcija sa najdužim periodom obnavljanja završi svoju regeneraciju. Stoga smo transporte za sve frakcije preračunali za period od 1845 minuta (vreme obnavljanja nukleo-proteida, jer je ono najduže).

Kada smo specifične brzine, količine transporta, odnosno vremena obnavljanja frakcija ucrtali u grafikon, odnosi su dobili sasvim konkretne oblike. Na osnovu grafikona izrađeni su zatim principi i kriterijumi za pokazatelje redosleda frakcija u procesu transporta fosfora u metaboličnom lancu. To nam je omogućilo da najzad rekonstruišemo i šemu reakcionog poretka za metabolizam fosfora u jetri pacova.

Kako u šemi nisu obuhvaćeni podaci o koncentracijama fosfora u frakcijama, bilo je nužno ustanoviti da li i one imaju neki značaj za reakcioni poredak, koji je inače bio konstruisan isključivo iz podataka o transportu i o specifičnim brzinama (sinteza i razlaganja). S obzirom da koncentracije frakcija u organizmu realno postoje, moraju naći mesto i ulogu i u našoj šemi reakcionog poretka. Načinjene su i tablice, koje su te odnose postavile na kvantitativnu osnovu. Pokazalo se da reakcioni lanac na zakonit način sjedinjuje funkciju transporta sa funkcijom akumulacije fosfora u koncentraciji frakcije.

Pomoću jednačine za koncentraciju omogućeno nam je da proverimo odnos kolektivne i posebne uloge svake frakcije u lancu. Pokazalo se da unutar jedne frakcije koncentracija ima vrednost ravnu kvadratu svog transporta, ako su obe veličine iskazane u ekvivalentima zajedničkim za sve frakcije lanca (kao osnovu za ekvivalenciju uzeli smo apsolutne

$$\frac{S}{R}$$

količine transporta i koncentracije, kao i vrednost  $\frac{K}{K}$  za kofermentata). Izuzetno je za grupu šećernih frakcija vrednost kvadrata transporta veća za 11% od odgovarajuće koncentracije. Ako su u lancu količine transporta sukcesivnih stadijuma ekvivalentne, interfrakcijski odnosi transporta i koncentracija, odnosno specifičnih brzina sinteza i razlaganja pokazuju određenu zakonitost. Tako napr. stabilna frakcija ATP-a i fosfolipoidi imaju bezmalo jednake vrednosti transporta, ali im se koncentracije ipak veoma razlikuju (u fosfolipoida veća je za 27,15 puta). Pokazalo se da razlika potiče otuda, što se specifično razlaganje u fosfolipoida vrši 27,6 puta sporije nego u stabilnoj frakciji ATP-a. S druge strane fosfolipoidi imaju podjednaku srazmeru između brzine specifične sinteze i specifičnog razlaganja sa kofermentima, pa ipak im koncentracije nisu jednake (u fosfolipoida koncentracija je 35,6 puta veća). Ustanovljeno je da to potiče od toga što fosfolipoidi imaju 5,96 puta veći transport, te je kvadrat toga broja ( $5,96^2$ ) ravan koncentraciji fosfolipoida. Dakle koncentracije dveju frakcija sa istim razlomkom

$$\frac{S}{R}$$

specifičnih brzina  $\frac{K}{K}$  razlikuju se isto toliko, koliko i kvadrati njihovih transporta. To važi kako za slučajeve gde prirodno postoji jednakost razlomaka specifičnih brzina, tako i za slučajeve u kojima je to izravnato računskim putem.

Jedinstvo lančanog sistema potvrđeno je naročito otkrićem stadijnog principa organizacije transporta (tri osnovna sukcesivna stadijuma) sa ekvivalencijama transporta pojedinih stadijuma. Najzad sposobnost lanca da povratnim snabdevanjem čeine frakcije aktivnim (organski vezanim-labilnim) fosforom obezbedi proces autoregeneracije, spada u

najjače potvrde funkcionisanja ovog metaboličnog lanca kao jedinstvenog procesa.

Uloga čeone frakcije (I stadijuma) bitno je različita od uloga frakcija iz završnog stadijuma lanca. Dok je za čeone frakcije (a pretežno i za frakcije srednjeg stadijuma) karakteristična skoro isključiva transportna uloga, prema minimalnoj ulozi akumulacije fosfora (transport nadmašuje koncentraciju: u I stadijumu 73,2 puta; u II stadijumu 47,3 puta, odnosno 43 puta). Naprotiv u frakciji nukleoproteida (iz III stadijuma) akumulaciona snaga frakcije nadmašuje transportnu za 2,33 puta.

Mnoge greške i propusti otežali su nam rad. Usled nejasnoće konkretnog zadatka (opšti je bio postavljen) nismo mogli najceliskodnije organizovati sakupljanje činjeničkog materijala. Kasno startovanje na merenja radioaktivnosti prisililo nas je da iskoristimo i rezultate drugih autora, mada uslovi njihovih eksperimenata, kao i zadaci, nisu bili slični našima. Čak smo usled toga kod šećera morali upotrebiti sasvim drugi put za utvrđivanje količine transporta.

I pored velikog broja sukcesivnih vremena, ipak je bilo nedovoljno za utvrđivanje napr. transporta kod svih frakcija (svega 12 vremena za merenje radioaktivnosti). S druge strane rascepanost analiza u različita vremena, učinila je da je ukupno veliki broj analiza ipak bio nedovoljan da u nekom posebnom vremenu obezbedi minimum analiza za udovoljenje principu statističke verovatnoće (u nekim vremenima analize vršene samo na 4 životinje, a maksimalno na 12 životinja). Prigovor o rascepanosti analiza u razna vremena otpada kada se rezultati iskazuju u procentima neorganske frakcije, jer se pokazalo da su proporcije raspodele radiofosfora jednake za sva vremena, nezavisno od apsolutnih količina radioaktivnosti.

Jedna od najnepovoljnijih posledica merenja radioaktiviteta u raznim vremenima ispoljava se u činjenici da se ista životinja ne može upotrebiti za razna vremena kada je potrebno uzimati uzorke iz unutrašnjih organa. Stoga su podaci za istu frakciju iz raznih vremena uvek dobiveni od drugih životinja, što veoma pogoduje oscilacijama nalaza.

Mnoštvo vremena dalo je i neke prednosti. Naime pokazalo se da, i pored progresivnog opadanja radioaktivnosti u sukcesivnim vremenima, proporcije raspodele ostaju manje više neizmenjene, što se ne bi sa takvom pouzdanošću mogla ustanoviti bez velikog broja vremenskih analiza.

Vremena izabrana za merenja radioaktivnosti imaju različito značenje za pojedine frakcije. Napr za 4 čeone frakcije sva merenja aktivnosti pala su u periodu posle zasićenja tih frakcija radiofosforom, tj. posle ustanovljavanja njegove konstantne raspodele. Tako je kod njih raspodela izračunata na maksimalnom broju analiza, ali nije uopšte bilo podataka za transport (zato smo ih pozajmili od drugih autora). Obrnut je slučaj u frakcijama fosfolipoida i nukleoproteida. U odnosu na njih polovina životinja je analizovana u periodu uspona radioaktiviteta, dok je druga polovina pacova ispitana u periodu ravnoteže prometa radiofosfora. Za izračunavanje transporta ove su frakcije od svih drugih u najpovoljnijem položaju, dok su usled toga u najnepovoljnijem položaju za izračunavanje raspodele radiofosfora.

Čini nam se da postoje razlozi, da na kraju ipak treba da budemo zadovoljni, jer nam ni methodske teškoće, niti eksperimentalni propusti, nisu sasvim onemogućili da izvršimo postavljeni zadatak. Čak su nas nagnali na inicijativu, da podemo izvesnim zaobilaznim putevima, ka rešavanju zadatka, što se u suštini takođe pokazalo korisnim. Stoga eksperimentalno ustanovljenim podacima (kao i iz njih izračunatim, napr. količine obnavljanja, odnosno transporta; specifične brzine sinteza i razlaganja, itd.) možemo ipak pripisati visok stepen verovatnoće. Šema reakcionog poretka izgleda nam ubedljiva, jer je konstruisana isključivo iz kvantitativnih podataka, kao i usled toga što pokazuje niz primera harmoničnog funkcionisanja lanca kao jedinstvenog procesa.

Imamo utisak da neke karakteristične činjenice iz tri dela naše publikacije o metabolizmu fosfora mogu poslužiti kao idikator, da rezultati naših ispitivanja sa mnogo verovatnoće daju sliku stvarnog reakcionog poretka fosforovog metabolizma u jetri pacova. Ponovićemo samo najtipičnije činjenice:

1) U našim analizama podudaraju se procenti raspodele običnog fosfora sa procentima distribucije radiofosfora.

2) Procentne raspodele običnog fosfora u frakcijama jetre (kod pacova) iz analize J. Sachs-a, poklapaju se vrlo dobro sa obim vrstama fosfora iz naših analiza (ako se uporede na bazi ekvivalencije šećernog fosfora).

3) Iz Rappoport-ovih i Hevesy-evih merenja radioaktivnosti (u periodu uspona) izračunati transporti sasvim se skladno uklapaju u naš reakcionarni poredak. Nađeno je da vrednosti koncentracija, koje smo (za odgovarajuće frakcije, primenom jednačine za koncentraciju) izračunali iz tog transporta, imaju skoro iste veličine sa eksperimentalno izmerenim koncentracijama.

4) Količina prenošenja fosfora preko šećernih frakcija harmonično se uključuje u reakcioni lanac, pored sve nepouzdanosti osnove, iz koje je izračunat transport te frakcije. Zanimljivo je da ovaj transport svega za oko 3,5% premašuje količinu fosfora, koja bi se morala transportovati saglasno zahtevu jednačine za koncentraciju (pomoću koje bi se transport izračunao iz stvarne koncentracije).

5) Naši nalazi potvrdili su ranije opšte zaključke Hevesy-a (davši im sasvim konkretnu formulaciju) o ulozi šećera u metabolizmu fosfora u jetri pacova.

6) Uloga frakcije u lancu može se specifično ostvariti samo na mestu, koje su joj odredili kriterijumi (utvrđeni iz reakcionih konstanti frakcije). Uloga svake frakcije adekvatna je njenoj stadijnoj adaptaciji. Njena transportna, kao i akumulaciona uloga potpuno su prilagođene stadijumu u kome se nalazi i frakcija.

Da reakcioni lanac funkcionise kao jedinstveni proces, pokazuju određeni indikatori:

1) Stadijna organizacija transporta fosfora može biti objašnjena samo na osnovu reagovanja lanca kao celine. Pomoću tri racionalno raspoređena stadijuma, lanac ostvaruje svoju prvenstveno energetska i plastičnu ulogu. Dok čeonne frakcije vrše skoro isključivo energetske uloge, dotle završne frakcije obezbeđuju plastične uloge u lancu (naročito nukleoproteidi i fosfolipoidi). Ostale frakcije vrše ili uloge posrednika, ili katalizatora u jetrinom metabolizmu.

2) Jedinstvo lanca potvrđuje se i kvantitativnim činjenicama: sva tri stadijuma lanca imaju izjednačene ekvivalente transporta. Transport fosfora je jedina spona među frakcijama ugrađenim u reakcioni poredak. To je dakle osnovni proces njihovog jedinstva. Sve drugo u stadijumima je različito.

3) Da je transport fosfora osnovno sredstvo korelacije među frakcijama sukcesivnih stadijuma, vidi se i iz činjenice, da kod izjednačenih bilansa između procesa sinteze i razlaganja (jednakost  $K^S/K^R$  za razne frakcije, kao napr. u kofermentima i fosfolipoidima) koncentracije takvih frakcija imaju vrednosti jednake sa kvadratima svojih transportata. Čak i u frakcijama sa nejednakim srazmerama između specifične brzine sinteze i razlaganja njihove koncentracije ipak imaju veličine proporcionalne kvadratu svojih transportata, s tom razlikom da je apsolutna (stvarna) vrednost koncentracije u svakoj frakciji prilagođena veličini odstupanja njenog razlomka za  $K^S/K^R$ . Izjednačenje kvadrata transporta sa koncentracijom odmah nastupa, ako se ova koriguje na odgovarajuću veličinu za izjednačene vrednosti za  $K^S/K^R$ .

4) Za razliku od ekvivalencije transporta fosfora, stadijumi ne pokazuju ekvivalencije svojih koncentracija (tj. zbira koncentracija frakcije tog stadijuma). Najmanja koncentracija postoji u I stadijumu (8,36). Sasvim neznatna je veća koncentracija frakcija II stadijuma (8,89). Nesrazmjerno je visak zbir koncentracija frakcija III stadijuma (162,95), jer oko 20 puta premašuje koncentraciju svakog od prvih dva stadijuma. Razlika potiče od nejednako raspoređenih specifičnih brzina sinteza i razlaganja duž lanca.

5) Mehanizam autoregulacije najjače potvrđuje da metabolizam fosfora u jetri pacova funkcioniše kao jedinstveno tekući proces.

#### A. SABOVLJEV, AN ATTEMPT AT RECONSTRUCTION WITH UTILIZATION OF RESULTS AND DATA OF PART I AND REACTION CONSTANTS DETERMINED IN PART II\*

##### Summary

Part I of the study on the metabolism of phosphorus in the liver of rats (17) recorded only the experimental results of our researches (i. e. their descriptive systematization only), whereas Part II was concerned with the computation of reaction constants of the metabolism in question (with quantities of phosphorus transport, the renewal periods of fractions, the specific velocities of the synthesis and those of the splitting of fractions *in vivo*) (18). In Part III, the present report, an attempt has been made to reconstruct — on the basis of the material of Part I and the reaction constants determined in Part II — the order of reaction in the metabolism of phosphorus in the liver of rats. Moreover, Part III is concerned with the relation between concentration

\* Order of reaction in Phosphorus metabolism in liver of rats.

and transport viewed from the perspective of individual fractions and of the reactive arrangement as a whole. The experimental material of Part I has also been found useful in working out a methodical (theoretical) basis for the computation of reaction constants in the system of irreversible chain metabolism (14). The equations that resulted from this study (14) have made it possible to elaborate Parts II and III.

In dealing with the problematic of this Part III, three themes have been discussed. The first of these is concerned with indicators of the order of reaction: bases have been established and principles defined for criteria that can serve as indicators of the site and role of each fraction in the reactive arrangement. Special criteria have been determined concretely for each fraction. In chapter 2, a reconstruction of the order of reaction has been attempted on the basis of concrete indicators from Chapter 1. A graphic illustration of the reactive arrangement has thus been made possible. Chapter 3, describes the role of fractions in the formation of their own concentrations through the instrumentality of transport and the co-action of synthesis reactions and the splitting process. Quantitative dependence of concentration upon the inflowing transport, and, conversely, the conditionality of the out-going transport upon concentration have also been established.

In addition to the criteria borrowed directly from Part I of the publication (percentual quantities of the renewal of fractions in the unit of time; the times of phosphorus syntheses of fractions; specific velocity of the synthesis and of the splitting of fractions), new bases have subsequently been computed in this chapter for concrete criteria of individual fractions as, for instance, absolute quantities of phosphorus renewal and those of phosphorus transmission in the unit of time; absolute and equivalent transport quantities of individual fractions in the time of the renewal of a metabolic cycle of the whole chain. All bases (except those of specific velocities illustrated in Table 4 of Part II of this publication — (18) are systematically set out in Table No. 1. In all computations the symbol 2 h stands for the time unit (this being the shortest period at which the measuring of phosphorus radioactivity in the fractions began), and 1845 m. represents the period of phosphorus renewal in the whole metabolic chain (which is identical with the period during which the fraction with the longest renewal, i. e. that of nucleoproteides, regenerates). In the sequence scheme itself, the transports have been given a period twice as long (i. e. 3690 m.), actually comprising two cycles of renewal of the chain, whereby computation with decimals has been avoided (e. g. in the ATP stable phosphorus fraction and those of adenylic acid). Absolute quantities of phosphorus transport for the renewal period of the whole chain (1845 m.) have been computed by multiplying the frequency rate of the period of renewal of the fraction by the quantity of its concentration. The absolute transport quantity of a fraction divided by the minimum of absolute transport among the fractions of the chain (in coferments = 19,3 mg) will give us the transport figure of the fraction in equivalent quantities. The round figures (i. e. the nearest integers except for two fractions where the equivalents represent halves between two integers) of these transport equivalents have been used as the principal basis (in addition to other criteria) for

a direct reconstruction of the chain. Thus the reconstruction of the chain has in principle been based upon the function of phosphorus transport through its fractions (combinations) in the liver of rats.

Graph 5 has been designed to facilitate comparisons of particular criteria for different fractions. All the bases mentioned for concrete criteria are recorded in the graph as graphically comparable quantities. Thus the task has been made considerably easier.

In chapter 2 of Part III an estimate has been made of the indicatory value of certain criteria. In order to be able to fulfil their respective roles at the fore-end of the metabolic chain, the fractions need to have the following features: a low rate of specific velocity of synthesis combined with a high rate of specific velocity of splitting; high values as regards both the absolute quantity of renewal and that of phosphorus transmission in the unit of time and for the whole period of the chain; and, lastly, a short period of time for a single renewal of a whole fraction combined with a high frequency rate of the totality of its renewal over the period of the whole chain (1845 m.). Properties opposed to those enumerated above have been made to serve as criteria that exclude the possibility of a fraction occupying a front position but, at the same time, being favourable to its being situated at the end part of the chain. This definition of the criteria ensures a frontal chain position for the fraction that reaches a great measure of transport within a short time, which, concurrently with a low specific velocity rate of synthesis provides a guarantee that a fraction with a later position in the chain shall be able to take up considerable quantities of phosphorus transport without delaying the process of transportation that goes on in it. The low underlying power for any prolonged stay of phosphorus at frontal fractions (which is conditioned by the low specific velocity of synthesis, in conjunction with simultaneous high specific velocity of splitting) is »condition sine qua non« for dealing effectually with the great volume of transport without an increase in the fractions' own concentrations, i. e. without a long stay of phosphorus in them.

As regards some of the fractions, it has been established that all of their criteria demand the identical position to be occupied by the respective fraction in the chain of reactive arrangement. This applies specially to the group of sugar fractions (and to the labile, or the stable fraction from ATP alike, but not to the other fractions, though). On the other hand, there are many fractions certain criteria of which are mutually contradictory, and it is owing to this that some of the criteria lay it down that the fraction should take a position at the fore-end of the chain, while others demand the contrary, i. e. a position at the end part. All these criteria have been given the rank of indicators the demands of which have to be satisfied without prejudice to other claims. As a matter of necessity, the criteria with excluding force have been given certain priority and full obligatoriness. The criteria opposed to these have been treated as facultative or auxiliary indicators that merely point to the possible position of the fraction. Contradictions among the criteria cannot be accidental, for they arise from the actual position of the fraction in the chain. Should for instance some criteria claim a frontal and others a posterior situation for a fraction, then the fraction

must occupy such a position as to be simultaneously situated among the frontal and the posterior fractions. In this situation, each criterium is logical, for it denotes something real. However, if a criterium is viewed only in relation to its partner (apart from the actual position of the fraction), then two of them appear to be quite contrary.

The system of indicators, which was built up exclusively on the basis of quantitative data, in its entirety provides information about the situation and characteristic behaviour of each fraction in the order of reaction. With the help of these criteria a clear view can be had not only of the bases but also of the structure of reactive arrangement in the metabolism of phosphorus in the liver of rats. Nine criteria (eight of which are illustrated graphically) have been set up for each fraction. A tenth criterium has been discovered subsequently after the scheme of the order of reaction had been completed. This criterium is of great value, for it shows subsequently and in a novel way that the reconstructed scheme also satisfies its own demands with regard to the arrangement of fractions in the chain.

When all indicators point to the same direction regarding the position of the fraction, it will be found quite easy to determine its situation and role in the chain. An example of this is provided first of all by the group of sugar fractions, where all the criteria without exception demand for it a position at the very front of the chain, which is in full agreement with the findings of Hevesy concerning the dependence of the amounts of organically bound phosphorus in the liver of rats upon the quantity of sugar contained in food. The frontal situation of sugar fractions also accords with our own findings to the effect that the proportions of phosphorus distribution in organic fractions of the liver of rats are almost identical with those found by Sachs (although the absolute quantities resulting from the two analyses are strikingly different) when our results and those of Sachs are compared on the basis of phosphorus equivalence in the group of sugar fractions (13, 17).

The convincingness of our scheme as regards the organization of the order of reaction in phosphorus metabolism in the liver of rats, derives not only from the fact that the system of criteria has been drawn exclusively from quantitative data but more particularly from the finding that the experimentally determined transport quantities fit, quite equivalently (without any deficiencies or excesses except for the group of sugar fractions) into the transport chain at the place and stage assigned to the fraction by other criteria.

The frontal position of sugar fractions derives in the first place from the fact that theirs is the lowest rate of specific velocity of synthesis simultaneously with the highest rate of specific velocity of splitting, etc. These fractions possess the enumerated conditions for a frontal situation to a greater degree than any of the organic fractions. Next after the sugar fraction comes the fraction of labile phosphorus from ATP, its criteria bearing the closest similarity to those of the sugar group. Since the labile fraction receives altogether 26 equivalents of phosphorus (out of 42 equivalents transmitted by sugar), it is clear that it must have a partner for the rest of the equivalents. Now there are two partners with criteria near to those that apply to sugars and the labile phosphorus,

and they are the stable phosphorus from ATP and the phospholipoids. As regards the stable fraction, its criteria all point to one direction requiring it to occupy the particular position. On the other hand, among the criteria of the phospholipoid fraction there are some that exclude this possibility (e. g. the slow rate towards the achievement of full transport capacity, small quantity of transmission in the initial period, etc.) requiring the fraction to take its position at the end part of the chain.

The labile and the stable fractions jointly transport a total of 39 phosphorus equivalents, which is 3 equivalents less than the transport capacity of sugar (42 equivalents in 3690 minutes). The analyses in chapter 3 of Part III have shown that the calculated sugar transport exceeds the value which, according to the equation relative to concentration, should correspond to the concentration actually found. The probability therefore exists that the excess is due to insufficient reliability of the basis for calculating the rate of transport in the group of sugar fractions. On the other hand, the excess of the transport may well by-pass the chain in performing its function of blood sugar regulator for the needs of synthesis and splitting of glycogen.

According to our criteria, the ATP transport its phosphorus at a very rapid rate, yet in such a way that the dynamics of the transport differ completely as regards the labile and the stable fraction. The stable phosphorus can only be transported from the ATP along with its organic carrier into the structure of free adenylic acid, the coferments and the nucleoproteids.

The consumers of labile phosphorus are of two types, (1) those that carry phosphorus into their structure, and (2) those that only use its energy. The greatest consumer of the type (1) are the phospholipoids which have all the qualifications needed for taking a position next to ATP; however, the above-mentioned exclusive indicators point to their being incapable of occupying a leading position in the principal line of transport. Nevertheless, this in no way prevents them from retaining this position in the chain, namely as a lateral branch of the chain. Thus the demands of all contradictory criteria of phospholipoids are met, for though situated at the end of the lateral branch, they are at the same time positioned directly behind ATP. The graph shows clearly that the phospholipoids occupy a distinct place in the chain; besides being positioned behind ATP they are also situated parallel to them, getting their amount of phosphorus out of glucose. That is to say, phosphorus as a labile fraction retrogrades to enter into the structure of glucose, from which it passes into and combines with phospholipoids in the form of glycerophosphates. Phospholipoids therefore are situated not only behind the ATP but at once parallel to them and at the lateral end of the chain. This position is reflected in the contradictory nature of the criteria themselves.

In the course of their transport the phospholipoids consume 12 equivalents of the total transport of labile phosphorus from the ATP (13 equivalents). None of the remaining fractions with an unassigned position possesses the criteria favourable enough to enable it to receive the unconsumed 13th part of labile phosphorus from the ATP. We must therefore look a likely consumer of this phosphorus elsewhere.

From the process involving the transmission of 12 equivalents of phosphorus to phospholipoids and of one equivalent of phosphorus to the unknown consumer, there resulted (through decomposition of ATP) 13 equivalents in all. It is characteristic of the fractions occupying positions at the end part of the chain that they are incapable — owing to their structures and criteria — of obtaining even one equivalent of labile phosphorus from the ADP (nor for that matter from the ATP). The three fractions at the lower end of the chain compete as consumers of stable phosphorus. Their joint capacity of intake equals the capacity of the ADP yield. In the process, these 3 consumers merely integrate the whole of the organic complex with the stable phosphorus built in.

Three equivalents of adenylic acid originate from the ADP which passes on to a consumer three parts of labile phosphorus. Our criteria throw a slightly different light on the position and role of this fraction; consequently, our conclusions differ from current opinion. According to experiments *in vitro*, the fraction in question could be used for the syntheses of all those organic compounds in whose structure it is found as a bound complex. Our experiments have revealed no qualitative but only quantitative grounds for our not being able to concur with current opinion; our objection however has an exclusive force. While the ATP becomes, according to Szent-Györgyi, reversibly rephosphorized (from the ADP, and this in turn from the free adenylic acid) in muscles when it works, no such phenomenon is observable in the liver of rats. Thus, for instance, if the free adenylic acid were able to meet the needs of the renewal of ATP, it would have to renew itself 13 times (within 3690 minutes), whereas, actually, it does so 3 times in all. Nor does the capacity of transport via the free adenylic acid meet the needs of regeneration of the nucleoproteids, for it could only satisfy one third of these. More interesting still is the case of coferments whose capacity of renewal could be amply satisfied by the free adenylic acid — with even a surplus of one equivalent of unused stable phosphorus. However, a comparison of the initial increase of radioactivity in these two fractions showed that the coferments had satisfied their capacity of regeneration before the free adenylic acid was able to transport the required amount of phosphorus. Consequently, the regeneration in question must have proceeded through other channels. The velocity rate of the renewal of coferments here does not correspond with the velocity the adenylic acid would need to enable it to fulfil its role. Therefore, the general conclusion must be to the effect that free adenylic acid is not an intermediate stage for the syntheses of combinations in which it is present as a bound component. It appears that the bound and the free acids are transported by different ways.

Though the free adenylic acid cannot provide us with any information as to its role in the metabolism of the liver in rats, such knowledge might be gained from the movements of its partner from which it separates at the moment of its formation. Its partners are the three equivalents of labile phosphorus which, as shown above, cannot be consumed by the fractions situated at the end part of the chain. Consequently, the possible consumers of the three equivalents of labile phosphorus from the ADP and of the 13th equivalent of labile phosphorus from the ATP must be sought among the frontal

fractions. Sugar seems to be the only likely consumer, for it is known from an earlier study of the metabolism of glucose (9, 10) and enzymologic researches (2) that glucose is able to join the process of decomposition only provided it first becomes transformed into hexozodiphosphorus acid, and in condition that it obtains for this stage both kinds of phosphorus from the labile fraction of ATP (respectively ADP). The above-mentioned transport surplus of 4 equivalents makes the conclusion inevitable that through these four equivalents only two mols of glucose can be caused to react. Moreover, studies by Ochoa and Lipmann (11, 7, 8) have shown that in complete oxidation any glucose can serve for the purpose of changing 24 new kinds of inorganic phosphorus into organically bound ones. It is obvious that two mols of activated glucose have a potential capacity high enough to effect the whole transport in the chain. There even remain unused 6 equivalents of the potential. It seems to us that we may assume that the capacity of glucose to provide the chain with inorganic phosphorus, and the capacity of the surpluses of labile phosphorus to activate glucose in the performance of its role, is not an accidental correspondense. On the contrary, we are convinced that the two processes are in mutual relationship as partners in the performance of the same task, viz. in the regeneration of the chain of phosphorus metabolism in the liver of rats. In point of fact, approximately 10 per cent of the activated phosphorus goes back from the stage of ATP and reenters the glucose, thus supplying it with the energy necessary to set in motion a new cycle of metabolism. From all that has been set out above there are grounds for supposing that the free adenylic acid in the liver of rats is produced as an irreversible and incidental product of the process by which the metabolic chain is provided with activated phosphorus for the needs of its autoregeneration.

Interesting is the destiny of 10 ADP equivalents the consumers of which can only be the coferments and the nucleoproteids, which integrate 10 equivalents of stable phosphorus. These fractions, however, lack the consumptive capacity for 10 equivalents of labile phosphorus, nor does the stable fraction enter into combination with them along the gradient of free adenylic acid. The only remaining possibility is that the labile phosphorus separates from the stable one in the act of synthesis at the moment when the ADP adenylic acid is passing over into the structure of coferments or nucleoproteids (making use of the energy present in its labile phosphorus).

At the end of chapter 2 it has been stated that the scheme as constructed makes possible an analysis of the order of reaction in the form of a uniform system. It can be seen that the entire transport process is accomplished in three basic stages. The first stage is effected by the group of sugar fractions transmitting 39 equivalents of phosphorus to the ATP to be built in there (two thirds of them as the labile fraction and one third as the stable one). The sugar fractions are first-class carriers, for it is they that activate phosphorus directly (inorganic into organic). The ATP is a second-class carrier because it obtains, as the only system at the second stage, phosphorus from the group of sugar fractions. All the other fractions get their supplies of phosphorus through the ATP and they are therefore third-class consumers and carriers. The third transport stage comprises, in various ways, five different

fractions including glucose which is, in other respects, the »genohead« of all first-class carriers. Glucose obtains, in retrograde way, about 10 per cent of activated phosphorus from the labile fraction, while taking approximately 90 per cent of phosphorus from the common inorganic fund. It is a feature worth noting that each of the three successive stages has the same equivalence of transport capacity as the other two (each stage obtaining and transmitting 39 equivalents at a time within a period of 3690 minutes).

In chapter 3 an analysis has been attempted of the relation between the transport and the accumulation roles of the fractions in the chain of transmittance. It is obvious that the frontal fractions with their high specific velocities of decomposition and low velocities of synthesis show a very pronounced function of transport and a minimum function of accumulation (73,2:1;-47,3:1;-43:1). On the other hand, with reference to the fractions at the end part of the chain with specific velocities of synthesis higher than those of decomposition, the transport function only just surpasses the accumulation function of the fraction (in the case of coferments and phospholipoids the relevant ratio is approx. 2:1 in favour of transport) or even the other way round, the accumulation function exceeds the transport function (nucleoproteid = 2,3:1 in favour of accumulation of phosphorus in the concentration).

In this chapter, the criterium of uniformity as regards the reaction of the reactive chain has been examined and checked from another aspect. The results have shown that in conditions of equivalence among transports of particular stages the proportions of concentrations in different fractions are in the same relations as the square proportions of their transports provided their fractions  $K^S / K^R$  are mutually equated. This applies in much the same degree both to the cases where this equation actually exists and to those where the equation of the fractions  $K^S / K^R$  has been arrived at by arithmetical computation. As the concentrations were determined by colorimetry and the transports computed from the quantity of the rise in radioactivity during the period of their increase in the fractions, this correspondence goes to show that the reaction chain functions as a uniform system, the factor of combination resting upon the transport of phosphorus by way of the chain.

At the end of chapter 3 the equations for computation of specific velocities in the running chain have been made to conform to the fact that the quantity of transport depends for its realization on the function of time.

## L I T E R A T U R A

1. Bertalamffy, L.: Theoretische Biologie — II Bd. — Bern — (1950).
2. Breusch, F. L.: Stoffwechsel der Kohlenhydrate — Physiol. Chemie — Berlin, — Heidelberg (B. Flaschenträger & E. Lehnartz) — (1954).
3. Gurney, R. W.: Ark. Kemi. Mineral. Geol., 143, 17 (1940).
4. De Groot, S. R.: Thermodynamics of irrenversible processes, Amsterdam — (1952).
5. Hevesy, G.: Radioactive indicators, New York-London — (1948).
6. Jost, A.: Handbuch d. norm. und pathol. Physiol., Bd. V (Bethe-Bergmann) Berlin — (1928).

7. Lipmann, F.: Green's Currents Biochem., Res. S. — 144.
8. Lipmann, F.: Adv. Enzymol.: 145 — (1941).
9. Magnus-Levy, A.: Handbuch d. Biochemie, Bd. 8, 399 — (1925).
10. Meyerhof, O.: Ergebn. Physiol., 39 — (1937).
11. Ochoa, S.: J. Biol. Chem., 138, 751 — (1941).
12. Pütter, A.: Vergleichende Physiologie, Jena — (1911).
13. Sachs, J.: J. Biol. Chem., 182/2, 655 — (1949).
14. Sabovljević, A.: Acta Naučnog društva NR Bosne i Hercegovine, Medic. VIII/4, 55 — (1957).
15. Sabovljević, A.: Ibid., VIII/4, 70 — (1957).
16. Sabovljević, A. i Perić, B.: Ibid, I, 179 — (1953).
17. Sabovljević, A, Bećarević, A, Micković, L. i Fajgelj, A.: Acta Naučnog društva NR Bosne i Hercegovine, Medic. IX/5 — (1958).
18. Sabovljević, A.: Ibid, X/6 — (1958).
19. Szent-Györgyi, A.: Acta litt-reg. Univ. Hung. Fr. Jozeph, Sect, Med. 9, 1 — (1937).
20. Szent-Györgyi, A.: Chemistry of muscular contraction, Academic press, New York — (1951).
21. Winterstein, H.: Handbuch d. Vergleichenden Physiologie, Jena — (1919—1925).

