

FUNKCJE DETOKSYKACYJNE WĄTROBY ZWIERZĘCEJ NA PODSTAWIE REAKCJI KATALAZ ZAWARTYCH W HEPATOCYTACH BYDŁĘCYCH

DETOXIFICATION FUNCTIONS OF ANIMAL LIVER BASED ON THE REACTION OF CATALASES CONTAINED IN BOVINE HEPATOCYTES

Aleksandra Piłat

ABSTRACT

The liver (*Iecur*) is an organ – it constitutes about 5% of the human body weight. It is part of the digestive system and has several functions. Since its lower surface is close to the organs of the abdominal (visceral) cavity, it is therefore referred to as visceral. The liver tissue is soft and elastic, so on its surface you can see the depressions caused by the adhesion of adjacent organs. Most of the liver lies under the diaphragm and is partially attached to it, therefore its position during breathing and diaphragm movements may change. The liver is an organ that participates in the metabolic pathways, converting sugars, fats, proteins, hormones, nutrients, drugs and toxins. Functions in the body mainly boil down to the neutralization of toxins, bile production, immune functions, heme transformations, storage of vitamins and glycogen, thermoregulation. From the point of view of the safety of the body, its most important role is to carry out the processes of neutralization of toxins. Therefore, hepatocytes are supplied with large amounts of peroxisomes which, by producing metabolically active catalase enzymes, protect the body against the effects of poisons. The aim of the experiment was to evaluate the effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) on the activity of catalases from liver cells of domestic cattle. The conducted experiment proved that the concentration of H_2O_2 influences the intensity of detoxification processes as evidenced by the foaming of H_2O_2 .

Słowa kluczowe: wermikompost, osad ściekowy, dżdżownica, bioutylizacja

Key words: *vermicompost, sewage sludge, earthworm, bio-utilization*

Aleksandra Piłat, kl. III, I Ogólnokształcące Liceum Akademickie im. Janiny Kossakowskiej-Dębickiej w Kielcach, e-mail: ola.pilat11@gmail.com

Opiekun merytoryczny/*Guardian substantive*: dr hab. Małgorzata Anna Józwiak

Wprowadzenie

Wątroba jest wewnętrznym narządem organizmu pełniącym różnorodne funkcje. Komórki które ją budują zwane hepatocytami są wszechstronne i pełnią najwięcej funkcji spośród wszystkich komórek organizmu człowieka. Z ich działaniem związana jest obecność ponad 700 enzymów. Najbardziej znaną rolą wątroby jest detoksykacja ponieważ komórki wątroby mają zdolność do unieczynnienia lub rozkładu wielu

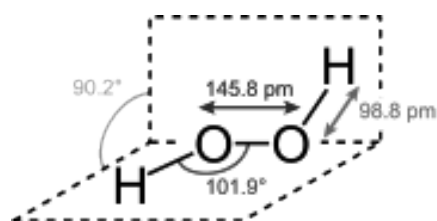
szkodliwych substancji, takich jak alkohol etylowy czy leki (<https://www.essentiale.pl/watroba>). Funkcja detoksykacyjna nie jest jej jedynym działaniem. W wątrobie odbywa się metabolizowanie wielu składników odżywczych, uczestnictwo w produkcji hormonów, enzymów, wprowadzanie amoniaku w cykl OCA, który przekształca go w mocznik, wytwarzanie żółci, która jest niezbędna do trawienia tłuszczów. Podstawowym metabolitem wątroby jest cholesterol, powstający z przemian cukrów, tłuszczu i niektórych

białek. Jest on prekursorem kwasów żółciowych i hormonów, takich jak: testosteron, estradiol, progesteron czy kortyzol. Hepatocyty pełnią także funkcje odpornościowe, ponieważ w nich odbywa się fagocytoza rozpadających się fragmentów komórek, bakterii oraz produktów procesów zapalnych (Sawicki 2005). Rolą wątroby jest również udział w przemianie hemu w bilirubinę, która jest składnikiem żółci. Wątroba wytwarza 85% wszystkich białek znajdujących się w osoczu m.in. albuminy oraz białka niezbędne do procesu krzepnięcia krwi a także przekształca białka i cukry w tłuszcze, wytwarza, gromadzi i uwalnia glukozę, bierze udział w termoregulacji i jest magazynem gromadząc zapasy witamin (A, D3, B2, B3, B4, B12, K) oraz żelaza. W ciągu jednej minuty, przez narząd ten, przepływa 1,5 l krwi, która jest filtrowana, co gwarantuje szybkie wychwytywanie trucizn, a przez to bezpieczeństwo organizmu. Ze względu na tak rozliczne funkcje wątroby zaburzenia jej funkcjonowania pociągają za sobą drastyczne skutki. Zaburzenia te wynikają ze spożywania ciężkostrawnych potraw i przetworzonej żywności, stosowania leków, picia alkoholu, a także sięgania po sterydy anaboliczno-androgenne kształtujące sylwetkę. Związki chemiczne niszcząco wpływające na wątrobę to środki zawierające grupę alfa-alkilową m.in. winstrol czy metanabol, które są hepatotoksyczne. Związki te zawarte w sterydach anaboliczno-androgennych obniżają jej aktywność i doprowadzają do jej dysfunkcji. Stosowanie środków anabolicznych czy alkoholu, nie są jedynymi przyczynami uszkodzeń wątroby. Marskość może być też wywołana przez WZW typu C oraz zaawansowaną niewydolność prawej komory serca. Na funkcje wątroby wpływają odkładane w pęcherzyku żółciowym kamienie powodujące zapalenie dróg żółciowych. Jednak wątroba odznacza się dużą zdolnością do regeneracji. Jest jedynym organem, który po usunięciu jego części, może się odtworzyć. Komórki wątroby wytwarzają również nadtlenek wodoru. Związek ten służy do syntezy kwasu żółciowego, bierze udział w utlenianiu kwasów tłuszczowych, rozkładzie puryn i aminokwasów. Z jego pomocą utrzymuje się równowaga hormonalna, normalizuje się poziom cukru we krwi i wytwarzana jest energia. Czynniki układu odpornościowego (białe krwinki i granulocyty) wytwarzają nadtlenek wodoru z tlenu cząsteczkowego i wody. Nadtlenek wodoru pomaga w transporcie makro- i mikroelementów do komórek. Utlenia substancje toksyczne i oczyszcza organizm z toksyn. Związek ten zapobiega rozwojowi komórek raka. W dotlenionym ciele komórki rakowe umierają. Za pomocą enzymu katalazy nadtlenek wodoru rozkłada się na wodę

i tlen atomowy. Z jego pomocą układ odpornościowy zabija wirusy; bakterie; mikroorganizmy grzybowe; pasożyty. Tlen atomowy przyczynia się do tworzenia witamin, soli mineralnych, poprawia metabolizm białek, tłuszczów i węglowodanów (Krzymowski, Przała 2005; Ganong 2007).

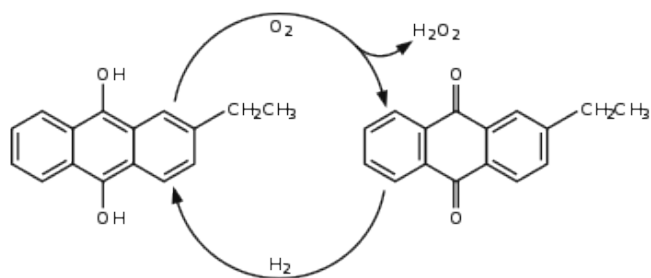
Budowa cząsteczki H₂O₂

Układ wiązań O–O–H wokół atomów tlenu w cząsteczce H₂O₂ jest nieliniowy (podobnie jak układ H–O–H w wodzie), ponadto atomy H–O–O–H tworzą kąt dwuścienny (w fazie stałej około 90°) (ryc. 1).



Ryc.1 Budowa cząsteczki nadtlenu wodoru w stanie stałym
Fig.1 Structure of a hydrogen peroxide molecule in the solid state

Obecnie H₂O₂ otrzymuje się najczęściej tzw. metodą antrachinonową (ryc. 2) przez utlenianie 2-etylo-9,10-antracenodiolu gazowym tlenem przepuszczanym przez roztwór tego związku w mieszaninie odpowiednio dobranych rozpuszczalników.



Ryc. 2. Synteza nadtlenu wodoru metodą antrachinonową
Fig. 2. Synthesis of hydrogen peroxide by the anthraquinone method

Rozcieńczony roztwór wodny nadtlenu otrzymany w tym procesie zatęża się przez odparowywanie wody pod zmniejszonym ciśnieniem, uzyskując w ten sposób roztwór o stężeniu 70%. Nadtlenek wodoru w temperaturze pokojowej jest syropowatą, bezbarwną (stężony staje się bładoniebieski) cieczą o temperaturze topnienia $-0,44^{\circ}\text{C}$ i temperaturze wrzenia około 150°C . Ma silne właściwości utleniające, wynikające z powstawania w czasie jego rozkładu tlenu atomowego. Czysty nadtlenek wodoru jest nietrwały i ulega egzotermicznemu rozkładowi na wodę i tlen pod wpływem

ciepła, światła nadfioletowego oraz kontaktu z niektórymi metalami i tlenkami metali. Mimo jego pozytywnego oddziaływania jego nadmiar wymaga kontroli ze strony organizmu ponieważ jest substancją żrącą wobec żywych tkanek (ryc. 3). Przy kontakcie ze skórą pojawiają się białe martwicze plamy. Najczęstszą postacią występowania nadtlenu wodoru jest tak zwany perhydrol, czyli jego 30% roztwór wodny, oraz roztwór 3%, nazywany wodą utlenioną. Enzymem, szybko i skutecznie rozkładającym nadtlenek wodoru jest katalaza obecna w wątrobie (Hassa i in. 2004; Galus 2008; Bartosz 2008; Bielański 2002).



Ryc. 3 Kontakt perhydrolu ze skórą
Fig. 3. Contact of perhydrol with skin

Materiały i metody

Komórki zwierzęce chronią się przed wpływem powstałego w procesach metabolicznych nadtlenu wodoru wytwarzając rozkładający go enzym – katalazę. Katalaza gromadzi się w pęcherzykach peroksysomalnych komórek ssaków. Jest białkiem enzymatycznym zbudowanym z czterech identycznych podjednostek o masie cząsteczkowej 60 kDa. Budowa chemiczna katalazy charakteryzuje się obecnością w każdej z podjednostek w jej centrum aktywnym grupy hemowej oraz cząsteczki NADPH. Dzięki temu wykazuje dwie aktywności: katalazową i peroksydazową. Przy dużym stężeniu nadtlenu wodoru główną jej funkcją jest udział w jego rozkładzie do wody i tlenu (aktywność katalazowa). Natomiast przy małym stężeniu H₂O₂ dominuje aktywność peroksydazowa katalazy, a substratami są związki o charakterze donorów wodoru np. etanol, metanol, fenol i inne.

W celu wykazania obecności katalazy w tkankach zwierzęcych przeprowadzono eksperyment laboratoryjny, w którym wykazano obecność katalazy w różnych rodzajach tkanek zwierzęcych.

Eksperyment I

Na rozdrobnioną bydlęcą tkankę mięśniową działano 3-procentowym roztworem H₂O₂ (woda utleniona).

Eksperyment II

Na rozdrobnione kości bydlęce działano 3-procentowym roztworem H₂O₂.

Eksperyment III

Na rozdrobnioną wątrobę bydlęcą działano 3-procentowym roztworem H₂O₂.

Zbadano również aktywność enzymu katalazy, stosując zróżnicowane stężenia nadtlenu wodoru działającego na komórki wątroby. Zmielony fragment wątroby bydlęcej podzielono na trzy części i umieszczono na szalkach Petriego. Pierwsza z próbek była próbką odniesienia/kontrolną, druga próbką badawczą, na którą stosowano 3-procentowy roztwór H₂O₂, trzecia próbką badawczą, na którą stosowano 30-procentowy roztwór H₂O₂ (perhydrol).

Celem potwierdzenia obecności i działania enzymu rozdrobnioną tkankę wątroby zwierzęcej umieszczono w pojemniku, a następnie w łaźni wodnej o temperaturze 60°C, pozostawiając na 30 min. Po 30 min zbadano obecność katalazy, zadając preparat wodą utlenioną – H₂O₂.

Charakterystyka obiektu badań

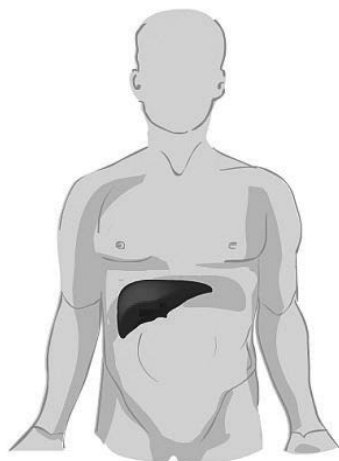
Budowa wątroby

Wątroba (*hepar*) jest gruczołem układu pokarmowego. U mężczyzn osiąga wagę 1500–1700 g, a u kobiet 1300–1500 g. Leży w prawym podżebrzu pod przeponą (ryc. 1). Ma cztery płaty: prawy (największy), lewy, czworoboczny i ogoniasty (fot. 1). Pokryta jest przez otrzewną oraz przez włóknistą błonę, zwaną torebką wątrobową (fot. 2). Wypełniona krwią może zwiększyć masę do 800g. 70–80% krwi otrzymuje z żyły wrotnej (jest to tzw. ukrwienie czynnościowe), a 20–30% przez tętnicę wątrobową właściwą (ukrwienie odżywcze). Żyła wrotna zbiera ubogą w tlen, a bogatą w czynniki odżywcze i sole mineralne krew z śledziony, żołądka i jelit. Tętnica wątrobową zasila ją krwią bogatą w tlen (fot. 3). Krwi wrotnej jest więcej aniżeli tej dostarczanej przez tętnicę wątrobową, a więc wątroba otrzymuje tlen przede wszystkim dzięki żyły wrotnej. Naczynia główne oraz przewód żółciowy wnikają do wątroby przez jej wnękę (ryc. 2). Przewód żółciowy wyprowadza żółć z pęcherzyka żółciowego do dwunastnicy (fot. 4). Komórki wątrobowe, hepatocyty stanowią 60–70% wszystkich komórek znajdujących się w wątrobie (ryc. 3, fot. 5). Hepatocyt jest komórką żyjącą około 1 roku. Poza hepatocytami w wątrobie występują także komórki wrzecionowate i gwiazdkowate

i mają one własności żerne oraz lipocyty gromadzące tłuszcz. Wątroba posiada duże zdolności regeneracyjne (Przespolewska i in. 2014).

Funkcje wątroby

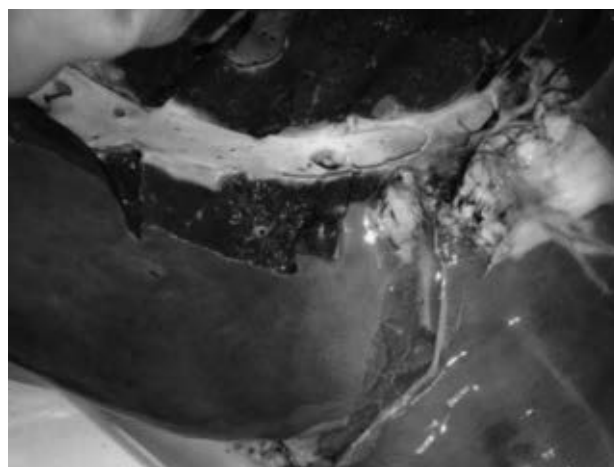
W wątrobie zachodzi wiele przemian biochemicznych. Przemianom tym podlegają węglowodany, białka i tłuszcze. Gospodarka węglowodanami polega na wytwarzaniu i gromadzeniu zapasowego glikogenu oraz uwalnianiu glukozy. Gospodarka tłuszczowa polega na przekształcaniu węglowodanów i białek w tłuszcze oraz syntezie lipoprotein, fosfolipidów i cholesterolu wykorzystywanego w 80% do wytwarzania kwasów żółciowych. Dokonuje się w niej również rozkład lipidów do kwasów tłuszczowych. W wątrobie wytwarzanych jest 85% białek znajdujących się w osoczu, takich jak albuminy czy protrombina niezbędna do krzepnięcia krwi. Powstają w niej aminokwasy niezbędne do syntezy białek strukturalnych i metabolicznych organizmu. Rozpad aminokwasów egzogennych uwalnia amoniak, z którego następnie w cyklu ornitynowym powstaje mocznik. Organ ten jest również miejscem gromadzenia zapasów witaminy A, D i B12 oraz żelaza. Znamienna jest funkcja detoksykacyjna dotycząca neutralizacji różnych toksyn, w tym alkoholu i amoniaku, degradowania hormonów, przemiany hemu w bilirubinę, wytwarzania żółci. Wątroba jest również narządem o istotnych własnościach odpornościowych. Jej zdolności immunologiczne polegają na fagocytozie zmienionych chorobowo tkanek lub patogenów przedostających się z zewnątrz drogą układu krążenia.



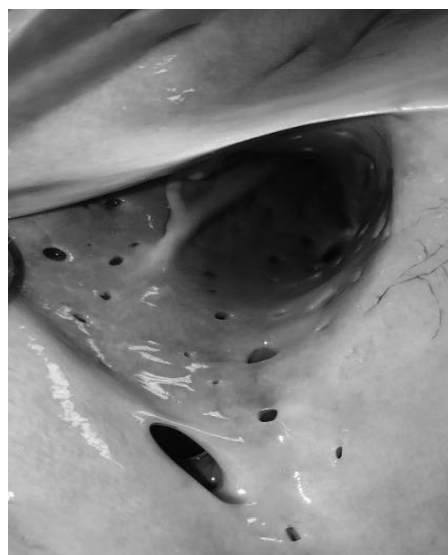
Ryc. 1. Położenie wątroby w jamie brzusznej
Fig. 1. The location of the liver in the abdominal cavity
<https://www.mp.pl/pacjent/gastrologia/choroby/watroba/50948,watroba-budowa-i-funkcje>.



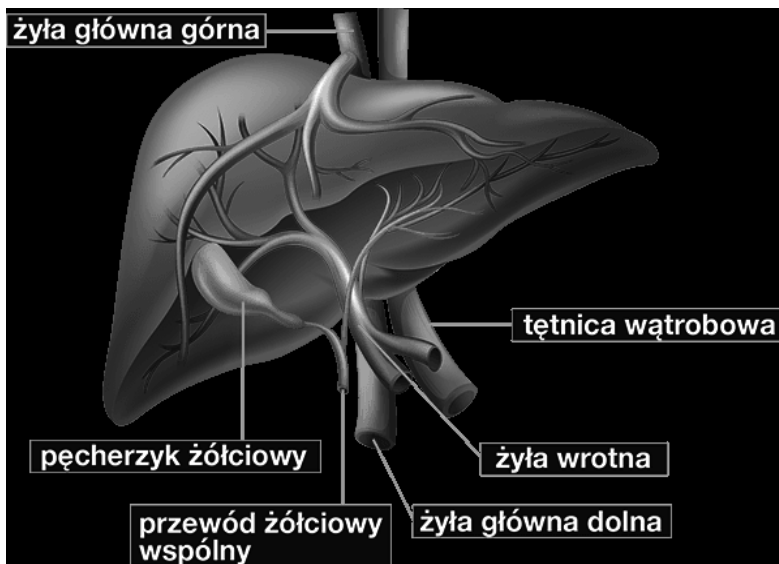
Fot. 1. Płatowa budowa wątroby (Fot. Piłat)
Photo 1. The lobe structure of the liver (Photo Pilat)



Fot. 2. Włóknista błona torebki wątrobowej (Fot. Piłat)
Photo 2. Fibrous membrane of the liver capsule (Photo Pilat)



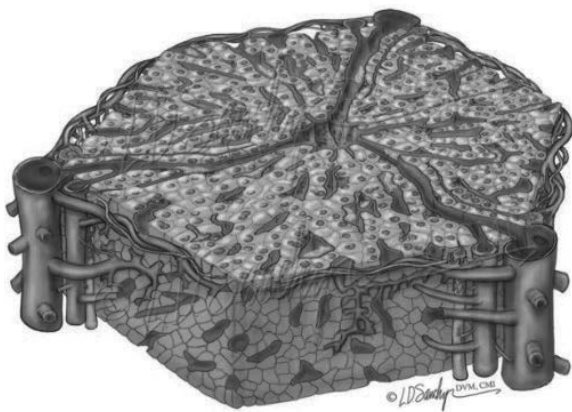
Fot. 3. Światło tętnicy wątrobowej (Fot. Piłat)
Photo 3. Lumen of the hepatic artery (Photo Pilat)



Ryc. 2. Unaczynienie wątroby

Fig. 2. Liver vascularization

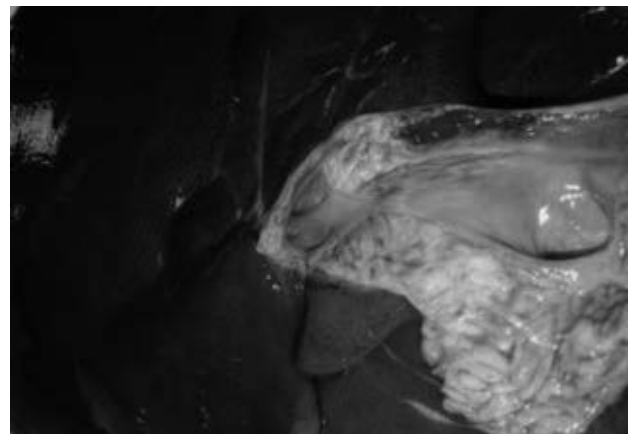
<https://www.mp.pl/pacjent/gastrologia/choroby/watroba/50948,watroba-budowa-i-funkcje>.



Ryc. 3. Zrazik wątrobowy zbudowany z hepatocytów

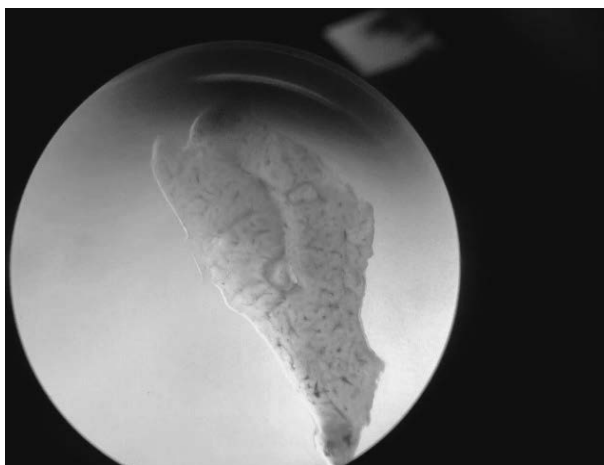
Fig. 3. Hepatic lobule made of hepatocytes

<https://www.bing.com/images/search?q=budowa+w%c4%85troby&qvvt=budowa+w%c4%85troby&form=IGRE&first=1&tsc=ImageBasicHover>.



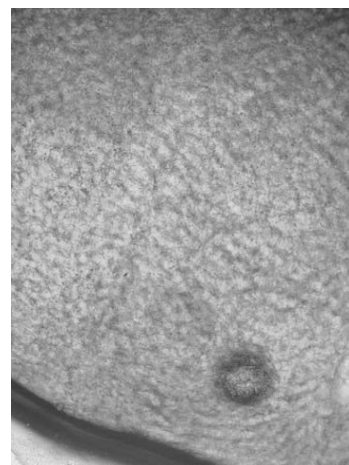
Fot. 4. Pęcherzyk żółciowy w wątrobie bydłowej (Fot. Piłat)

Photo 4. Gall bladder in bovine liver (Photo Pilat)



Fot. 5. Hepatocyty z mięszu wątroby bydłowej (Fot. Piłat)

Photo 5. Hepatocytes from bovine liver parenchyma (Photo Pilat)



Wyniki

Woda utleniona to wodny roztwór nadtlenu wodoru (H_2O_2). Powszechnie dostępny jest roztwór 3-procentowy. Nadtlenek wodoru ulega rozkładowi, ponieważ nie jest substancją trwałą. Jego rozkład zachodzi zgodnie z równaniem; $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Reakcja ta przebiega w dwóch etapach. Etap pierwszy to $H_2O_2 \rightarrow H_2O + 1/2O_2$ (powstaje jednoatomowy tlen/rodnik tlenowy), etap drugi to powstanie tlenu cząsteczkowego z dwóch cząsteczek rodnika ($2O \rightarrow O_2$). Dodanie do wody utlenionej katalizatora, którym mogą być substancje zawarte we krwi, powoduje gwałtowny rozkład H_2O_2 . Uwalniane są w krótkim czasie duże ilości rodników tlenu, powodując efekt pienienia, czyli gwałtowny rozkład wody utlenionej z uwolnieniem tlenu.

Wyniki eksperymentu I

Kiedy na rozdrobnioną bydlęcą tkankę mięśniową działano 3-procentowym roztworem H_2O_2 (woda utleniona), zaobserwowano pojedyncze pęcherzyki gazu.

Wyniki eksperymentu II

Kiedy na rozdrobnione kości bydlęce działano 3-procentowym roztworem H_2O_2 , nie zaobserwowano pęcherzyków gazu.

Wyniki eksperymentu III

Kiedy na rozdrobnioną tkankę wątroby bydlęcej działano 30-procentowym roztworem H_2O_2 zaobserwowano intensywne pienienie się, obfite występowanie pęcherzyków gazu.

Badanie aktywności katalazy

Badanie aktywności katalazy przeprowadzono na tkance pozyskanej z rozdrobnionej wątroby zwierzęcej. Aktywność enzymu katalazy oceniano stosując zróżnicowane stężenia nadtlenu wodoru. Zmielony fragment wątroby bydlęcej podzielony na trzy części umieszczono na szalkach Petriego.

W próbce odniesienia/kontrolnej potraktowanej wodą nie zaobserwowano żadnych reakcji chemicznych.

Drugą próbkę, która była próbką badawczą, traktowano 3-procentowym roztworem H_2O_2 . W tym przypadku zaobserwowano gwałtowne, obfite pienienie z wydzielaniem dużych ilości gazu.

Wobec trzeciej próbki badawczej zastosowano 30-procentowym roztwór H_2O_2 (perhydrol). W pierwszym etapie obserwacji stwierdzono krótkotrwałe pienienie się próbki, następnie tkanka zmieniła wygląd i zbiałała, straciła również swoją konsystencję, stwardniała i stała się sztywna.

Działanie 3-procentowym roztworem H_2O_2 na roz-

drobnioną tkankę wątroby umieszczoną w łaźni wodnej nie wywołało efektu pienienia na powierzchni próbki.

Wnioski

1. Badanie obecności enzymu katalazy w tkance kostnej dało ujemny wynik.

2. Minimalna ilość pęcherzyków gazu, który pojawił się na powierzchni tkanki mięśniowej po zadaniu wodą utlenioną może świadczyć o obecności niewielkich ilości krwi w badanej tkance, pobudzającej procesy rozkładu nadtlenu wodoru.

3. 30-procentowy roztwór nadtlenu wodoru jest substancją żrącą wobec żywych tkanek i powoduje nieodwracalne zmiany w ich strukturze.

4. Destrukcyjne działanie nadtlenu wodoru w dużych stężeniach wymaga ścisłej kontroli jego poziomu w organizmie.

5. Obecność enzymu katalazy stwierdzono w tkance wątroby na podstawie intensywnego pienienia się, czyli rozkładu nadtlenu wodoru, który następuje pod jej wpływem

6. Utrzymywanie rozdrobnionej tkanki w łaźni wodnej w temperaturze $60^\circ C$ przez 30 min powoduje denaturację białka enzymu, dlatego w tej próbce brak efektu rozkładu nadtlenu wodoru, który przeprowadza aktywna katalaza.

Literatura

- Bartosz G., 2008, Nadtlenek wodoru. W: Druga twarz tlenu. Wyd. 2. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN, s. 28, 46, seria: Środowisko. ISBN 978-83-01-13847-9.
- Bieleński A., 2002, Podstawy chemii nieorganicznej, wyd. 5, Warszawa: PWN, s. 606–607, ISBN 83-01-13654-5.
- Ganong W., 2007, Fizjologia. J. Lewin Kowalik (red. nauk., tłum.). Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, s. 485. ISBN 978-83-200-3326-7.
- Galus M., 2008, Tablice chemiczne, Warszawa: Wydawnictwo Adamantan, s. 171–170. ISBN 978-83-7350-105-8.
- Hassa R. (red.), Mrzigod J. (red.), Nowakowski J., 2004, Podręczny słownik chemiczny, Katowice: Videograf II, s. 259–260, ISBN 83-7183-240-0.
- Krzymowski J., Przała J., 2005, Fizjologia zwierząt: podręcznik dla studentów wydziałów medycyny weterynaryjnej, wydziałów biologii i hodowli zwierząt akademii rolniczych i uniwersytetów: praca zbior., Warszawa: Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, s. 379–382. ISBN 83-09-01792-8.

- Przespolewska H., Kobryń H., Szara B. & Bartyzel J., 2014, Podstawy anatomii zwierząt domowych. Warszawa: PWN, s. 90-93. ISBN 978-83-62815-22-7.
- Sawicki W., 2005, Histologia. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, s. 430–431. ISBN 83-200-3127-3.

Netografia

- <https://www.essentiale.pl/watroba>.
- <https://www.mp.pl/pacjent/gastrologia/choroby/watroba/50948,watroba-budowa-i-funkcje>.
- (<https://www.bing.com/images/search?q=budowa+w-%c4%85troby&qpvf=budowa+w-%c4%85troby&form=IGRE&first=1&tsc=ImageBasicHover>).

STRESZCZENIE

Wątroba (*Iecur*) jest organem – stanowiącym ok. 5% masy ciała człowieka. Wchodzi w skład układu pokarmowego i pełni kilka funkcji. Ponieważ jej dolna powierzchnia leży w pobliżu narządów jamy brzusznej (trzewnej), stąd określana jest mianem trzewnej. Tkanka wątroby jest miękka i elastyczna, dlatego na jej powierzchni można zobaczyć zagłębienia spowodowane przyleganiem sąsiadujących narządów. Większa część wątroby leży pod przeponą i jest z nią częściowo zrośnięta, dlatego jej położenie podczas oddychania i ruchów przepony może się zmieniać. Wątroba jest narządem, który uczestniczy w szlakach metabolicznych, dokonując przemian cukrów, tłuszczów, białek, hormonów, substancji odżywczych, leków i toksyn. Funkcje w organizmie sprowadzają się głównie do neutralizacji toksyn, wytwarzania żółci, funkcji odpornościowych, przemianach hemu, magazynowaniu witamin i glikogenu, termoregulacji. Z punktu widzenia bezpieczeństwa organizmu najbardziej istotną jej rolą jest przeprowadzanie procesów neutralizacji toksyn. W związku z tym hepatocyty zaopatrzone są w duże ilości peroksyosomów, które wytwarzając enzymy, katalazy aktywne metabolicznie chronią organizm przed skutkami działania trucizn.

Celem przeprowadzonego eksperymentu była ocena wpływu nadtlenu wodoru (H_2O_2) na aktywność katalaz pochodzących z komórek wątroby bydła domowego. Przeprowadzony eksperyment dowiódł, że stężenie H_2O_2 wpływa na intensywność procesów detoksykacji o czym świadczyło pienienie się H_2O_2 .