

# Uloga katalize u stanici

---

**Delonga, Franka**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:971111>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-26**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ULOGA KATALAZE U STANICI**

**ZAVRŠNI RAD**

**FRANKA DELONGA**

**Matični broj: 56**

**Split, rujan 2020.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE**  
**TEHNOLOGIJE**  
**PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

**ULOGA KATALAZE U STANICI**

**ZAVRŠNI RAD**

**FRANKA DELONGA**

**Matični broj: 56**

**Split, rujan 2020.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**  
**FOOD TECHNOLOGY**

**THE ROLE OF CATALASE IN CELL**

**BACHELOR THESIS**

**FRANKA DELONGA**

**Parent number: 56**

**Split, September 2020**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско – tehnološki fakultet Split  
Prehrambena tehnologija

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Dr.sc. Ivana Carev

**Pomoć pri izradi:** Dr.sc. Ivana Carev

### ULOGA KATALAZE U STANICI

Franka Delonga, 56

**Sažetak:** Reaktivne kisikove vrste sadrže reaktivan kisik koji proizvode živi organizmi kao rezultat staničnog metabolizma. Obrambeni mehanizam koji sprječava oštećenja uzrokovana reaktivnim kisikovim vrstama predstavljaju antioksidansi koji mogu biti enzimski i neenzimski. Enzimi su proteinske molekule tercijarne ili kvarterne strukture koje imaju katalitičku sposobnost i specifičnost za određene kemijske reakcije. Katalaza je enzim iz skupine oksidoreduktaza, tetramerne je strukture i koristi se u raznim industrijama i medicini. Oksidacijski stres je neravnoteža između ROS-a i antioksidansa. Uzročnik je raznih bolesti i oštećenja molekula (DNA, lipida, proteina). Uzročnici oksidacijskog stresa, ROS, u normalnim količinama ne štete organizmima, ali u visokim koncentracijama dovode do raznih modifikacija molekula. Peroxisomi su specijalizirani organeli za provođenje reakcija oksidacije pomoću molekularnog kisika. Oni generiraju vodikov peroksid koji koriste u oksidacijske svrhe i sadrže katalazu kako bi uništili višak štetnih kisikovih spojeva. Glavna funkcija katalaze je antioksidativna. Katalaza djeluje kao agens u borbi protiv reaktivnih kisikovih spojeva i razgrađuje vodikov peroksid u vodu i kisik, te hidrolizira preko milijun molekula supstrata u sekundi. Cilj rada je ukazati na prisutnost oksidacijskog stresa, čimbenike koji ga uzrokuju i ulogu katalaze u sprječavanju oksidacijskog stresa.

**Ključne riječi:** ROS, enzim, antioksidansi, oksidativni stres, katalaza

**Rad sadrži:** 42 stranica, 8 slika, 87 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### **Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Prof.dr.sc. Mladen Miloš - predsjednik
2. Izv.prof.dr.sc. Mila Radan - član
3. Dr.sc. Ivana Carev – član - mentor

**Datum obrane:** 21. rujna 2020.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku** pohranjen u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Food Technology**

**Scientific area:** Natural Sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty Chemistry and Technology, session no. 28

**Mentor:** Ivana Carev, PhD

**Technical assistance:** Ivana Carev, PhD

### THE ROLE OF CATALASE IN CELL

**Franka Delonga, 56**

**Abstract:** Reactive oxygen species contain reactive oxygen produced by living organisms as a result of cellular metabolism. The defence mechanism that prevents damage caused by reactive oxygen species is represented by antioxidants that can be enzymatic and nonenzymatic. Enzymes are protein molecules of tertiary or quaternary structure that have catalytic ability and specificity for certain chemical reactions. Catalase is enzyme from the group of oxidoreductases, it has a tetrameric structure and is used in various industries and medicine. Oxidative stress is an imbalance between ROS and antioxidants. It is the cause of various diseases and damage of molecules (DNA, lipids, proteins). The causes of oxidative stress, ROS, in normal quantities do not harm organisms, but in high concentrations they lead to various modifications of molecules. Peroxisomes are specialized for carrying out oxidation reactions using molecular oxygen, generating hydrogen peroxide and contain catalase to destroy the excess of ROS. The main function of catalase is antioxidant activity. Catalase acts as an agent in the scavenging of reactive oxygen species and decomposes hydrogen peroxide into the water and oxygen. It hydrolyses over the million substrates of the molecules per second. The aim of this work is to point out the presence of oxidative stress, the factors that cause it and, conversely, the non-enzymatic and enzymatic antioxidants that can prevent it.

**Keywords:** ROS, enzyme, oxidative stress, antioxidants, catalase

**Thesis contains:** 42 pages, 8 pictures, 87 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Mladen Miloš, PhD, full prof., chair person
2. Mila Radan, PhD, associate prof., member
3. Ivana Carev, PhD, supervisor

**Defence date:** September 21<sup>th</sup>, 2020

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom dr. sc. Ivane Carev, u razdoblju od veljače do rujna 2020. godine.*



## **ZAHVALA**

*Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ivani Carev na strpljivosti, susretljivosti i posvećenom vremenu tijekom izrade završnog rada, te na prenesenom znanju. Hvala svim profesorima koji su svojim zalaganjem prenosili znanje tijekom studiranja. Hvala mojim prijateljima i kolegama na poticanju, ohrabrivanju i pomoći. Posebno hvala mojoj obitelji na pomoći, odricanju i vjeri u uspjeh.*

## SAŽETAK

Reaktivne kisikove vrste sadrže reaktivan kisik koji proizvode živi organizmi kao rezultat staničnog metabolizma. Obrambeni mehanizam koji sprječava oštećenja uzrokovana reaktivnim kisikovim vrstama predstavljaju antioksidansi koji mogu biti enzimski i neenzimski. Enzimi su proteinske molekule tercijarne ili kvarterne strukture koje imaju katalitičku sposobnost i specifičnost za određene kemijske reakcije. Katalaza je enzim iz skupine oksidoreduktaza, tetramerne je strukture i koristi se u raznim industrijama i medicini. Oksidacijski stres je neravnoteža između ROS-a i antioksidansa. Uzročnik je raznih bolesti i oštećenja molekula (DNA, lipida, proteina). Uzročnici oksidacijskog stresa, ROS, u normalnim količinama ne štete organizmima, ali u visokim koncentracijama dovode do raznih modifikacija molekula. Peroxisomi su specijalizirani organeli za provođenje reakcija oksidacije pomoću molekularnog kisika. Oni generiraju vodikov peroksid koji koriste u oksidacijske svrhe i sadrže katalazu kako bi uništili višak štetnih kisikovih spojeva. Glavna funkcija katalaze je antioksidativna. Katalaza djeluje kao agens u borbi protiv reaktivnih kisikovih spojeva i razgrađuje vodikov peroksid u vodu i kisik, te hidrolizira preko milijun molekula supstrata u sekundi. Cilj rada je ukazati na prisutnost oksidacijskog stresa, čimbenike koji ga uzrokuju i ulogu katalaze u sprječavanju oksidacijskog stresa.

**Ključne riječi:** ROS, enzim, antioksidansi, oksidativni stres, katalaza

## **SUMMARY**

Reactive oxygen species contain reactive oxygen produced by living organisms as a result of cellular metabolism. The defence mechanism that prevents damage caused by reactive oxygen species is represented by antioxidants that can be enzymatic and nonenzymatic. Enzymes are protein molecules of tertiary or quaternary structure that have catalytic ability and specificity for certain chemical reactions. Catalase is enzyme from the group of oxidoreductases, it has a tetrameric structure and is use din various industries and medicine. Oxidative stress is an imbalance between ROS and antioxidants. It is the cause of various diseases and damage of molecules (DNA, lipids, proteins). The causes of oxidative stress, ROS, in normal quantities do not harm organisms, but in high concentrations they lead to various modifications of molecules. Peroxisomes are specialized for carrying out oxidation reactions using molecular oxygen, generating hydrogen peroxide and contain catalase to destroy the excess of ROS. The main function of catalase is antioxidant activity. Catalase acts as an agent in the scavenging og reactive oxygen species and decomposes hydrogen peroxide into the water and oxygen. It hydrolises over the million substrates of the molecules per second. The aim of this work is to point out the presence of oxidative stress, the factors that cause it and, conversely, the non-enzymatic and enzymatic antioxidants that can prevent it.

**Key words:** ROS, enzyme, oxydative stress, antioxidants, catalase

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. OPĆI DIO.....	3
1.1 Reaktivne kisikove vrste i oksidativni stres.....	3
1.1.1. Oštećenje makromolekula.....	7
1.1.2. Bolesti uzrokovane oksidacijskim stresom.....	9
1.2. Hormeza.....	11
1.3. Antioksidansi.....	12
1.4. Enzimi.....	16
1.4.1 Kinetika enzimom kataliziranih kemijskih reakcija.....	17
1.4.2. Enzimi u prehrambenoj industriji.....	20
1.5. Katalaza.....	21
1.5.1. Struktura i raspodjela u različitim organizmima.....	22
1.5.2. Funkcija katalaze.....	24
1.5.3. Kemijska reakcija i molekularni mehanizam.....	24
1.5.4. Klinički značaj i primjena.....	26
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	28
2.1. Metode određivanja katalaze.....	28
2.1.1. Manometrijsko određivanje aktivnosti katalaze.....	28
2.1.2. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti katalaze.....	29
3. RASPRAVA.....	31
3.1. Uloga katalaze u stanici.....	31
4. ZAKLJUČAK.....	34
5. LITERATURA.....	35

## UVOD

Reaktivni kisikovi spojevi su kemijski reaktivne molekule koje sadrže vrlo reaktivan kisik. U umjerenim koncentracijama ovi spojevi sudjeluju u normalnim fiziološkim staničnim procesima, međutim kada su prisutne u visokim koncentracijama, dolazi do narušavanja prirodne ravnoteže i nastanka do oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres dovodi do štetnih modifikacija, poput uništavanja važnih staničnih molekula, proteina i lipida.

Antioksidansi su molekule koje predstavljaju obrambeni mehanizam za sprječavanje oštećenja važnih staničnih molekula i slabljenja funkcija stanica, koje nastaju kao posljedica oksidacije. Antioksidanse dijelimo na enzimske i ne-enzimske. Neenzimske antioksidanse unosimo hranom i oni pomažu u regulaciji prirodne ravnoteže u stanicama. Enzimski antioksidansi su dio unutarstanične strukture i služe u osiguravanju prirodne ravnoteže i sprječavanju oksidacijskog stresa. U enzimske antioksidanse spadaju enzimi superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation transferaza, glutation reduktaza i proteini albumin i transferin.

Hormeza je stanje stanične ravnoteže u kojem stanice, izložene niskim dozama kemijskog spoja ili faktora iz okoliša, reagiraju na način da taj kemijski spoj uzrokuje blagotvoran učinak na stanice, dok u visokim dozama dovodi do oštećenja stanica. (1) Hormeza predstavlja fenomen odnosa doza – odgovor koji karakterizira stimulacija malim dozama i inhibicija visokim dozama. (2) U posljednje vrijeme pojam hormoneze sve se više pojavljuje kod istraživanja starenja i neurodegenerativnih bolesti. Male doze određenog biološki aktivnog spoja mogu potaknuti stanične obrambene reakcije koje omogućuju organizmu da postane otporniji na podražaje. (3)

Enzimi su organizirane proteinske molekule koje imaju tercijarnu ili kvarternu strukturu. Sastoje se od polarne aminokiselinske grupe na površini i nepolarnih ostataka okrenutih prema unutrašnjosti enzima. Poznati su po svojoj katalitičkoj moći i specifičnosti za pojedine kemijske reakcije i supstrate u živim organizmima. Ubrzavaju kemijske reakcije tako da smanjuju energiju aktivacije. Često enzimi djeluju samo na jednu vrstu reakcije ili u nekim slučajevima na skup srodnih reakcija. (4) Na brzinu i odvijanje enzimskih reakcija utječu fizikalni uvjeti poput temperature i pH vrijednosti. Enzime klasificiramo prema vrsti reakcije koju vrše na oksidoreduktaze, transferaze, reduktaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze.

Enzimi su važni u prehrambenoj industriji jer utječu na boju, okus, teksturu i kvalitetu proizvoda. Mogu uzrokovati pozitivne promjene poput zgušnjavanja mlijeka, dozrijevanja voća i starenje mesa ili negativne promjene poput posmeđivanja voća i pojave neugodnih mirisa. (5)

Enzim katalaza pripada skupini oksidoreduktaze koje kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije. Katalaza je prvi je enzim koji je dobio ime. Struktura mu je tetramerna i sastavljen je od četiri polipeptidna lanca koji sadrže petsto aminokiselina. Sadrži četiri hem skupine koje omogućavaju reagiranje s vodikovim peroksidom. Nalazi se u gotovo svim aerobnim organizmima gdje je izolirana u visokom stupnju čistoće. (6)

Katalaza je bitna za neutralizaciju štetnog vodikovog peroksida i indikator je razgradnje ugljikohidrata. Koristi se u raznim industrijama poput tekstilne, prehrambene i farmaceutske industrije. (7) Najvažnija joj je uloga antioksidacijsko djelovanje koje stanice koriste kod unutar-staničnog oksidacijskog stresa. To stanje uzrokuje razne bolesti i poremećaja poput kardiovaskularnih bolesti, raka, neuroloških poremećaja, dijabetesa, ostalih bolesti i starenja.

Metode određivanja prisutnosti katalaze dijele se na kvantitativne i kvalitativne. Kvantitativne metode su spektrofotometrijska i kolorimetrijska, a kvalitativna metoda je određivanje prisutnosti katalaze u bakterijama pomoću vodikovog peroksida koji se prevodi u kisik.

## 1. OPĆI DIO

### 1.1 Reaktivne kisikove vrste i oksidativni stres

Godinama se istraživalo postojanje reaktivnih kisikovih oblika i oksidacijskog stresa. Istraživanja su doživjela vrhunac 50-ih godina 20. stoljeća kada se otkrilo da reaktivni kisikovi oblici nastaju kao produkti raznih staničnih oksido – redukcijских procesa i da utječu na oštećenje stanica, nastanak tumora i degenerativnih bolesti. Druga faza intenzivnih istraživanja počela je 60-ih godina 20. stoljeća kada se otkrilo da reaktivni kisikovi oblici uzrokuju oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNA), proteina i lipida. U tom razdoblju otkrilo se i djelovanje antioksidacijskih enzima. Treća, posljednja faza, počela je 90-ih godina 20. stoljeća i nastavlja se i danas. U toj fazi otkriveni su pozitivni učinci reaktivnih kisikovih oblika koji pokazuju važnost u fiziološkim funkcijama poput proliferacije stanica, diferencijacije stanica i programiranoj staničnoj smrti. (8)

Reaktivne kisikove vrste (ROS) su kemijski reaktivne molekule koje sadrže vrlo reaktivan kisik. (9) S kemijskog stajališta, slobodni radikali su svaki atom, molekula ili njezin dio koji posjeduje nespareni pobuđeni elektron u vanjskim molekularnim ili atomskim orbitalama. (10)

Slobodne radikale proizvode živi organizmi kao rezultat staničnog metabolizma. U normalnim do umjerenim koncentracijama slobodni radikali sudjeluju u normalnim fiziološkim staničnim procesima, međutim kada su prisutne u visokim koncentracijama dovode do štetnih modifikacija lipida, proteina i DNA. (11, 12) Smatra se da u eukariotskim organizmima više od 90% slobodnih kisikovih oblika proizvodi mitohondrijski lanac transporta elektrona.

Slobodni radikali nastaju endogeno i egzogeno. Endogeno nastajanje predstavlja nastajanje u metaboličkim procesima, a egzogeno nastajanje predstavlja nastajanje prilikom izlaganja suncu i vanjskom zračenju, konzumiranjem cigareta, te pod djelovanjem teških metala. Konzumacija cigareta, kao i sami dim cigareta, sadrži mnogo oksidansa, slobodnih radikala i organskih spojeva kao što su dušični oksidi i superoksidi. Udisanjem dima aktiviraju se neki endogeni mehanizmi poput nakupljanja neutrofila i makrofaga. (13)

Reaktivni oblici kisika uključuju ione kisika, slobodne radikale i perokside, anorganske ili organske. Tu spadaju:

- Superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ )
- vodikov peroksid ( $H_2O_2$ )
- hipokloritna kiselina ( $HClO$ )
- hidroksilni radikal ( $OH\cdot$ )
- peroksilni radikal ( $RO_2\cdot$ ) (8)

Proizvodnja superoksidnog radikala događa se u mitohondrijima. Mitohondrijski lanac transportnih elektrona glavni je izvor adenzin trifosfata (ATP) u stanici sisavaca i zato je ključan za život. Mali broj elektrona tijekom transporta prijeđe na kisik prerano pritom stvarajući slobodne radikale. Hidroksilni radikal predstavlja neutralni oblik hidroksidnog iona. Karakterizira ga velika reaktivnost što ga čini iznimno opasnim radikalom s kratkim vremenom poluživota. Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima gdje se troši kisik. Vodikov peroksid se zatim koristi za oksidaciju raznih staničnih molekula. (14)

Reaktivne kisikove vrste utječu na cijeli organizam čovjeka, uključujući srčani sustav, kožu, koštani sustav, oči, mozak, probavni sustav, bubrege, pluća, krvne žile i multiorganska oštećenja. (8) Poznato je da hidroksil radikal reagira sa svim komponentama molekula DNA, oštećujući purinske i pirimidinske baze, kao i deoksiribozu.

Glavni problemi prisustva slobodnih radikala u živim organizmima odnosi se na:

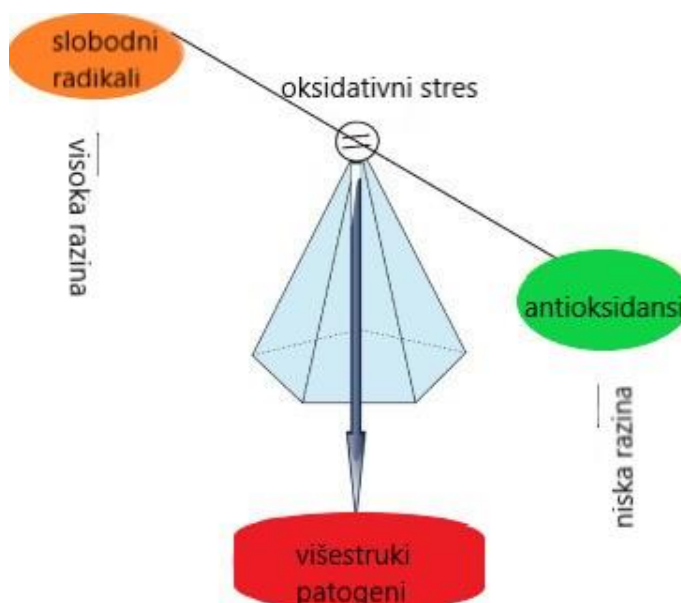
- visoku reaktivnost i nisku stabilnost slobodnih radikala
- niske koncentracije antioksidansa
- niska kemijska specifičnost
- raznolikost reakcija u kojima mogu sudjelovati
- kompliciranu prostornu raspodjelu u stanici
- promjene u fiziološkim uvjetima organizma (10)



Unatoč brojnim negativnim učincima, reaktivni kisikovi oblici imaju i neke pozitivne učinke poput:

- ubijanja mikroorganizama
- služe kao drugi glasnik
- sudjeluju u staničnoj diferencijaciji i proliferaciji
- reguliraju pretvorbu signala i transkripcija (9)

Oksidacijski stres je metaboličko stanje organizama u kojem je povećana razina reaktivnih kisikovih vrsta. On dovodi do narušavanja staničnog metabolizma, oštećenja stanica te u konačnici do razvoja bolesti.



Slika 1. Prikaz ravnoteže pri nastanku oksidacijskog stresa (8)

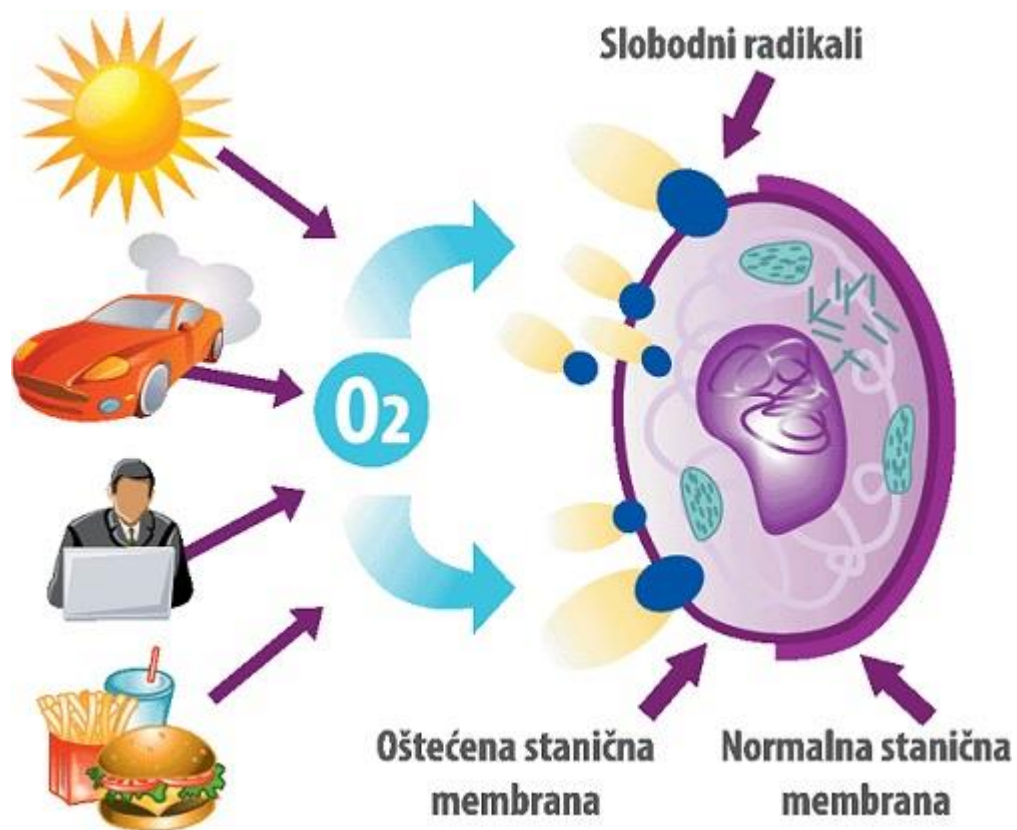
Pojam oksidacijskog stresa koristi se od 1985. godine i opisuje neravnotežu prooksidansa i antioksidansa. Oksidacijski stres može se klasificirati prema intenzitetu, sa skalama intenziteta od fiziološkog oksidacijskog stresa do toksičnog oksidacijskog stresa koji oštećuje biomolekule. Stanice i organi svakodnevno su izloženi djelovanju oksidansa, a izvori se mogu podijeliti na endogene i egzogene izvore. (15)

Egzogeni izvori oksidacijskog stresa uključuju izloženost kisiku, zračenju, teškim metalima, zagađivačima zraka, suncu, bakterijama i virusima te hrani. (16)

Endogeni izvori oksidacijskog stresa uključuju različite stanične organele poput mitohondrija, peroksisoma i endoplazmatskog retikuluma gdje je potrošnja kisika velika. (17)

Reaktivne kisikove vrste djeluju na biomolekule, odnosno na lipide, proteine i DNA. Reaktivne kisikove vrste mogu reagirati s nekoliko aminokiselinskih ostataka. Aminokiseline u peptidima se razlikuju po osjetljivosti na napad reaktivnih kisikovih vrsta, a oblici aktiviranog kisika se razlikuju po potencijalnoj reaktivnosti. Ostaci aminokiselina cisteina i metionina su posebno osjetljivi na oksidaciju. (18)

Enzimi koji imaju metale u blizini aktivnih mjesta osjetljivi su na oksidaciju uzrokovanu metalima jer to može spriječiti njihovu aktivnost. Oksidacijski stres, također, može uzrokovati peroksidaciju lipida uzrokujući različit raspored u membranskom sloju. Većina dugoročnih učinaka oksidacijskog stresa uočena je kod DNA gdje dolazi do degradacije baza, loma DNA, purinske i pirimidinske ili šećerne modifikacije. Modifikacije DNA su važne jer dovode do neurodegenerativnih, kardiovaskularnih ili autoimunih bolesti. (18)



Slika 2. Utjecaj egzogenih izvora ROS-a (9)

U normalnim uvjetima stanice su u stanju uravnotežiti proizvodnju oksidansa i antioksidansa. U homeostatskom stanju razine reaktivnih kisikovih vrsta i antioksidansa su ravnoteži. Povećanjem proizvodnje ROS-a može se premašiti antioksidacijsko djelovanje što dovodi do pojave oksidacijskog stresa. (20) Oksidacijski stres nastaje

kada su stanice podvrgnute višku reaktivnih kisikovih oblika ili kao rezultat iscrpljivanja antioksidansa. (21) U tom slučaju enzimski i ne-enzimski antioksidansi ne mogu u potpunosti neutralizirati reaktivne kisikove oblike koji uzrokuju daljnje razvijanje reakcija. Pri tome dolazi do oksidacije biomolekula uz pomoć reaktivnih kisikovih oblika. Kada dođe do oksidacijskog stresa, stanice pokušavaju umanjiti štetu oksidacijskog učinka i obnoviti ravnotežu da ne bi došlo do različitih patoloških stanja poput kardiovaskularnih bolesti, raka, neuroloških poremećaja, dijabetesa, ostalih bolesti i starenja. Oksidacijski stres usko je povezan s disfunkcijom mitohondrija, a upravo mitohondriji su generatori i mjesto djelovanja reaktivnih kisikovih oblika. (22) Oksidacijski stres igra ulogu u razvoju placente i patofiziologiji pluća nakon čega dolazi do komplikacija poput spontanog pobačaja, preeklampsije i preuranjene rupture membrana. (23) Smatra se da oksidacijski stres igra važnu ulogu u procesu starenja i bolestima koje se vežu na starenje. Na starenje utječe i ultraljubičasto zračenje (UV) zbog čega dolazi do velike proizvodnje ROS-a. (24) Uz starenje, oksidacijski stres često se javlja kod fizičkih aktivnosti. Iako je fizička aktivnost poželjna, nekada može uzrokovati oksidacijski stres koji može postati kroničan. Zbog toga je poželjan unos antioksidansa u umjerenim količinama. (25)

### **1.1.1. Oštećenje makromolekula**

Oksidacijski stres, odnosno ROS, uzrokuju oštećenje makromolekula:

- DNA
- lipida
- proteina

Niža koncentracija ROS-a bitna je za normalnu signalizaciju stanica, dok veća koncentracija i dugotrajna izloženost uzrokuju oštećenja staničnih makromolekula što u konačnici rezultira staničnom smrću. (19) Reakcija ROS-a s makromolekulama stvara dodatni ROS.

Reaktivne kisikove vrste induciraju:

- oštećenje DNA
- oksidaciju proteina
- ometa disanje mitohondrija
- stimulira ili ometa staničnu proliferaciju

Oksidacijska oštećenja DNA uzrokuju modifikaciju:

- purinske i pirimidinske baze
- deoksiribozne kralježnice
- jednostruke i dvostruke strune
- umreženje ostalih molekula.

Modifikacije DNA potencijalno su mutagene i doprinose raku, preranom starenju i neurodegenerativnim bolestima. Važna meta ROS-a je mitohondrijska DNA koja kodira trinaest polipeptida (mtDNA), dvadeset i dvije prijenosne RNA (tRNA) i dvije ribosomske RNA (rRNA). Sve su one ključne za stvaranje proteina ključnih za transport elektrona i stvaranje ATP-a oksidacijskom fosforilacijom. (26)

Oštećenje DNA može biti potaknuto ionizacijskim zračenjem, fotooksidacijom (UV zračenje, svjetlo) ili raznim oksidacijskim sredstvima što dovodi do oštećenja kromosoma ili njihovog prekida. (27) Najpoznatije oštećenje DNA oksidacijskim stresom je stvaranje 8-hidroksigvanina koji je potencijalni biomarker za karcinogenezu. (28)

Proteini su glavna meta ROS-a zbog:

- povećanih količina u odnosu na ostale stanične komponente
- visoke reaktivnosti s ROS-om.

Oksidacija proteina stvara reverzibilne disulfidne mostove, mijenja im formiranje i na kraju im uništava funkciju. Jačina oštećenja dijelom ovisi o položaju proteina u odnosu na mjesto nastanka ROS-a, te o sastavu i strukturi. Reaktivni kisiokvi spojevi, također, mogu promijeniti sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina, oksidirati bjelančevine i formirati karbonilne skupine (aldehid i keton) na različitim bočnim lancima aminokiselina. (20) Karbonilacija se događa radi reakcije s reaktivnim aldehidima koji su dobiveni lipidnom peroksidacijom. Aldehidi se zatim vežu na lance lizina, histidina i cisteina te formiraju produkte lipoksidacije. Ostali bočni lanci aminokiselina poput prolina, metionina, valina, treonina, alanina, aspartata, triptofana i izoleucina mogu se povezati izravno s ROS formirajući karbonil proteine.

Reaktivne kisikove vrste mogu izazvati:

- peroksidaciju lipida i
- poremetiti membranski dvoslojni lipidni raspored koji može inaktivirati receptore i enzime vezane na membranu te povećati propusnost stanica.

Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal ( $\text{OH}\cdot$ ), a sam proces lipidne peroksidacije obilježuju tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Polinezasićene masne kiseline su najizloženije lipidnoj peroksidaciji. Slobodni radikali koji mogu peroksidirati polinezasićene masne kiseline su:  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  te  $\text{RO}_2\cdot$ . (30)

U procesu lipidne peroksidacije nastaju peroksidni radikali koji oštećuju lančanu strukturu lipida te se lipidne molekule raspadaju na manje fragmente pa se time gubi membranski kontinuitet. Uz djelovanje željeza ili bakra, stvaraju se mnogobrojni produkti poput aldehida, ketona, ugljikovodika i aktivnih radikala. (30)

Proizvodi lipidne peroksidacije mogu inaktivirati mnogo staničnih proteina stvaranjem umreženih bjelančevina. (28) Iako specifični produkti oksidacije lipida mogu djelovati kao signalne molekule i imati zaštitne stanične učinke, oštećeni ili oksidirani lipidi mogu imati štetne učinke koji mogu dovesti do oštećenja neurona ili smrti. (31)

### **1.1.2. Bolesti uzrokovane oksidacijskim stresom**

Oksidacijski stres, odnosno neravnoteža koja se javlja u prisustvu ROS-a, uzrokuje razne poremećaje i bolesti. Neke od bolesti koje se sve češće javljaju su rak, dijabetes i neurodegenerativne bolesti. Rak je glavni uzrok smrti diljem svijeta. Pretežno ga uzrokuju čimbenici iz okoliša te način života, odnosno pušenje, UV zračenje kojem smo izloženi, prehrana i slično. Rak je složeni proces koji uključuje mutacijske promjene i nekontroliranu proliferaciju stanica. Endogeni i egzogeni izvori reaktivnih kisikovih vrsta uzrokuju oksidacijski stres u stanicama. To može dovesti do oštećenja i modifikacije makromolekula te napredovanja raka. (32)

Ubrzani metabolizam stanica raka uzrokuje obilno stvaranje ROS-a iz mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma, kao i djelovanje NADPH oksidaze. U stanicama raka, visoka brzina produkcije može biti uravnotežena antioksidacijskim djelovanjem kako bi se održala ravnoteža i izbjegao oksidacijski stres. Ukoliko stanice ne kontroliraju količinu ROS-a, tada su osjetljive na staničnu smrt djelovanjem oksidacijskog stresa.

Tako u stacionarnom stanju stanice raka mogu pokazati povećanje ili smanjenje ROS-a u usporedbi s normalnim stanicama. (33)

Alzheimerova bolest je neurodegenerativni poremećaj mozga koji uzrokuje demenciju. Karakteristična je degeneracija neurona u selektivnoj regiji mozga koja djeluje na emocionalno ponašanje i kognitivno ponašanje. Oštećenje koje se pokreće oksidacijskim stresom uzrokovano je lipidnom peroksidacijom membranskih sustava poput plazma membrane i mitohondrijske membrane. Dokazano je da oksidacijski stres igra štetnu ulogu u patogenezi Alzheimerove bolesti što dovodi do oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina. S obzirom da oksidacijski stres predstavlja stanje neuravnoteženosti između ROS-a i antioksidansa, kod Alzheimerove bolesti oksidacijski stres proizlazi iz nakupljanja oksidiranih ili oštećenih makromolekula koje se ne uklanjaju učinkovito i nakupljaju se. Uz disfunkciju mitohondrija, kao potencijalni izvori oksidacijskog stresa pokazali su se ioni metala, poput bakra i željeza. (34)

Pojedinci s blagim Alzheimerom pokazuju:

- povećanu razinu peroksidacije lipida i oksidaciju nukleinskih kiselina u moždanom tkivu
- povećanu razinu peroksidacije lipida i oksidaciju nukleinskih kiselina u cerebrospinalnoj tekućini, plazmi, urinu i perifernim leukocitima
- smanjenu razinu antioksidansa u plazmi i ukupni antioksidativni kapacitet plazme (35)

Općenito, sve neuro-degenerativne bolesti mogu biti uzrokovane oksidacijskim stresom jer mozak troši veliku količinu kisika i bogat je lipidima. Osim toga, neuronske membrane bogate su poli-nezasićenim masnim kiselinama koje su osjetljive na ROS. (19)

Dijabetes je heterogena skupina kroničnih poremećaja koja je karakterizirana povećanom koncentracijom glukoze u krvi. Povezan je s povećanom proizvodnjom slobodnih radikala ili smanjenom aktivnošću antioksidacijskog sustava što dovodi do oksidacijskog stresa. (17)

Oksidacijski stres kompromitira dva glavna mehanizma ključna kod dijabetesa, a to su :

- izlučivanje inzulina
- djelovanje inzulina

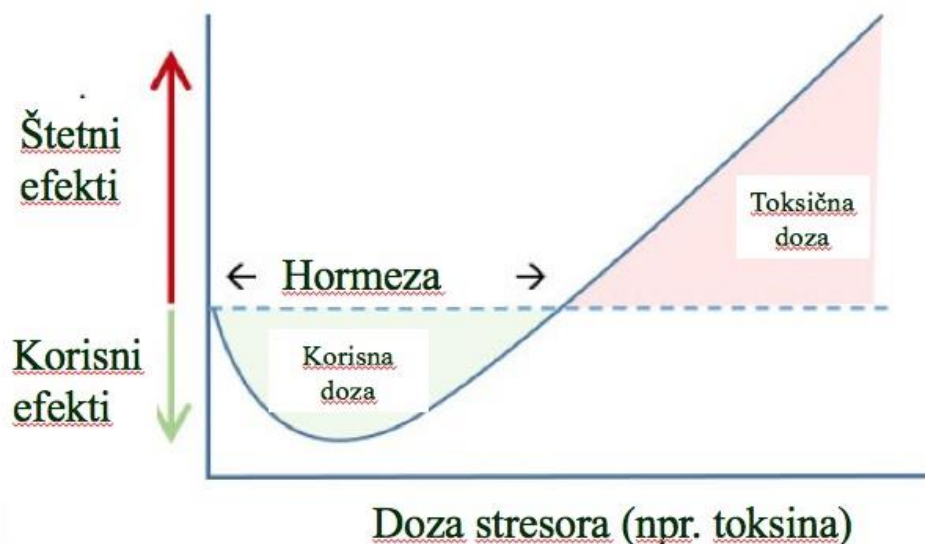
Molekularni putevi za koje je primijećeno da doprinose oksidacijskom stresu uključeni su ili u metabolizam glukoze ili u metabolizam lipida. Peroksidacija lipida je primarno stanično oštećenje koje nastaje uslijed djelovanja slobodnih radikala. Uglavnom su to stanične lipidne strukture pri čemu nastaje hidroperoksid. Hiperglikemija potiče formiranje ROS-a iz raznih izvora, a oni uključuju oksidacijsku fosforilaciju, auto-oksidaciju glukoze, sintezu dušičnog oksida, NADPH oksidaze i slično. (22)

Primijećeno je da se povećan oksidacijski stres pojavio prilikom testiranja na pretilim osobama prije nego im je dijagnosticiran dijabetes. Uočena je povećana lipidna peroksidacija, karbonilacija proteina i stvaranje orto – tirozina, te meta – tirozina u osoba s dijabetesom. Nakon pravilnije prehrane došlo je do smanjenja pokazatelja oksidacijskog stresa. (36)

## **1.2. Hormeza**

Hormeza je stanje stanične ravnoteže u kojem prilikom izlaganja niskim dozama kemijskog spoja ili faktora iz okoliša dolazi do njegovog blagotvornog učinka na organizme ili stanice, dok u visokim dozama dolazi do oštećenja. (37)

Pojam hormeza prvi su primijenili 1943. godine Southam i Erlich na primjeru gljivičnih reakcija na raznim biljnim ekstraktima. Hormeza je dvofazni odgovor na dozu koji karakterizira stimulacija niskim dozama i inhibicija visokim dozama. (38) Iz toga proizlazi da su niske doze biološki aktivnih spojeva pogodne za zdravlje, samo je potrebno paziti da to bude umjereno jer visoke doze uništavaju zdravlje. Dobar primjer toga je korištenje alkohola, umjereno doprinosi smanjenoj smrtnosti, dok suprotno čini štetu i uzrokuje cirozu jetre, rak i neurološke poremećaje. (39)



Slika 3. Mehanizam hormeze (40)

### 1.3. Antioksidansi

S obzirom na stalne napade ROS-a, u stanicama je razvijen sofisticiran obrambeni mehanizam za sprječavanje oštećenja i slabljenja funkcija koje su posljedica oksidacije, a nazivaju se antioksidansi. (20) Antioksidansi igraju vitalnu ulogu u prehranbenim sustavima, kao i u ljudskom tijelu kako bi se smanjili oksidacijski procesi i štetni učinci ROS-a. U prehranbenim sustavima usporavanje lipidne peroksidacije i stvaranje sekundarnog produkta može se spriječiti upotrebom hranjivih molekula antioksidansa. Tako se održava naklonost, boja i tekstura prehranbenog proizvoda tijekom skladištenja. Također, antioksidansi pomažu smanjenju oksidacije proteina i interakciji sa karbonilima, što dovodi do promjene funkcije proteina. (41) Antioksidansi koje unesemo hranom, konzumiranjem voća i povrća, povezani su s ravnotežom između slobodnih radikala i antioksidativnog stanja. Oni pomažu u smanjenju oksidacijskog stresa, a samim time u sprječavanju razvoj bolesti poput raka, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti i slično. (42)

Antioksidansi mogu biti neenzimski:

- polifenoli
- askorbinska kiselina
- vitamin A
- melatonin



- alfa - tokoferol
- beta - karoten
- glutation

Polifenoli su antioksidansi koji reagiraju u oksidacijskim uvjetima s amino skupinama bočnog lanca što dovodi do stvaranja proteina umreženih veza. Biljke su ih sintetizirale kao odgovor na stresne situacije. Polifenoli smanjuju razinu oksidativnog oštećenja u proteinima, lipidima, ugljikohidratima i DNA u živim stanicama i tkivima. (43)

Askorbinska kiselina, poznata kao vitamin C, ima jaka redukcijska svojstva. Vitamin C podupire funkciju epitelne barijere protiv patogena i potiče aktivnost kože koja uklanja oksidante i time štiti stanice od oksidativnog stresa. Nedostatak vitamina C rezultira oslabljenom imunološkom funkcijom i većom osjetljivošću na infekcije. Antioksidativni učinci vitamina C mogu se značajno povećati kombinacijom vitamina E. (44)

Vitamin A ili retinol je vitamin topljiv u mastima i organskim otapalima. Retinol vrši antioksidativno djelovanje uklanjanjem peroksilnih radikala. Deficit vitamina A uzrokuje noćno sljepilo i poremećaj ribonukleinske kiseline (RNA). (45)

Melatonin je enzim kojeg proizvodi epifiza i šalje ga u krv. Uzrokuje pospanost i, s vremenom, utonuće u san. Antioksidativno djelovanje melatonina poznato je po tome što u suradnji s drugim antioksidansima, poput superoksid dismutaze, djeluje kao čistač slobodnih radikala. (46)

Alfa – tokoferol ili vitamin E je antioksidans koji štiti polinezasićene masne kiseline u membrani od oksidacije, može regulirati proizvodnju ROS-a i kontrolirati prijenos signala. Vitamin E je glavni antioksidans topljiv u mastima koji uklanja peroksilne radikale i prekida oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina. U prisutnosti vitamina E, peroksilni radikali reagiraju s alfa – tokoferolom umjesto s lipidnim peroksidom pa se zaustavlja lančana reakcija proizvodnje radikala. (47)

Beta – karoten ili provitamin A je antioksidans koji se pretvara u vitamin A i igra ključnu ulogu u borbi protiv slobodnih radikala. Provitamin A djeluje u borbi protiv raka i jača imunološki sustav. (48)

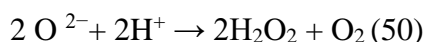
Glutation je tripeptid, sastavljen od aminokiselina glicina, cisteina i glutaminske kiseline, koji se bori protiv reaktivnih kisikovih vrsta. Glavni je unutarstanični tiolni spoj kojeg proizvodi većina stanica sisavaca u dvije uzastopne enzimske reakcije.

Antioksidativna funkcija glutathiona određena je tiolom (-SH) cisteina koji postane oksidiran kada glutathion reducira ROS. (49)

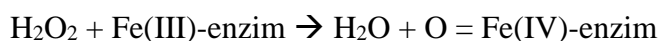
Antioksidansi, također, mogu biti i enzimski.

- superoksid dismutaza
- katalaza
- glutathion - reduktaza
- glutathion - transferaza
- glutathion - peroksidaza
- albumin
- transferin

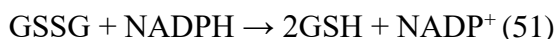
Superoksid dismutaza je bjelančevina koja kao kofaktore sadrži metalne ione bakra, željeza, nikla, mangana i cinka. Katalizira dismutaciju superoksidnog aniona u kisik i vodikov peroksid. Važan je u obrani stanica koje su izložene aerobnom metabolizmu.



Enzim katalaza sadrži četiri porfirinske hem skupine u feritnom stanju. Hem skupine mu omogućavaju da reagira s vodikovim peroksidom i tako konvertira vodikov peroksid u vodu i kisik. (43) Katalaza s vodikovim peroksidom djeluje u dvije reakcije:



Glutathion reduktaza je flavoprotein koji koristi NADPH da bi se reduciraio glutathion disulfid (GSSG) na glutathion (GSH). Uglavnom se nalazi u kloroplastima, a u manjim količinama ga nalazimo u citosolu i mitohondrijima. Reduciranjem sprječava oksidaciju tiolnih skupina te reagira s hidroksil radikalom (OH $\cdot$ ) i kisikom (O $_2$ ).



Glutathion transferaza je enzim koji katalizira prijenos funkcionalnih skupina s jedne molekule na drugu, tj. sa supstrata na akceptorske molekule. Supstrati za glutathion transferaze su herbicidi, pesticidi, razni zagađivači, aldehidni derivati ili lipidni peroksidi. Glutathion transferaza omogućava izlučivanje štetnih tvari iz organizma tako što ih čini lakše topljivima i stabilnijima.



Glutation peroksidaza zajedno s katalazom i superoksid dismutazom pripada prvoj liniji obrane. Aktivan je unutar stanica, u staničnim stijenkama i izvan stanica. Glutation peroksidaza u svojoj strukturi sadrži hem. U normalnim uvjetima i uvjetima stresa eliminira višak vodikovog peroksida i sudjeluje u biosintezi lignina.



Albumin je negativno nabijeni protein visoke topljivosti i stabilnosti. Najzastupljeniji je protein u plazmi. Jednostavan je protein i nedostaju mu prostetske skupine. Albumin se lako veže na otrovne reaktivne vrste metala i njihove tiolne skupine. Lako se veže na molekule koje uključuju metabolite, plinove ili lijekove. (53)

Transferin je glikoprotein koji čvrsto veže željezo, ali reverzibilno. Sastoji se od dva reznja, na N- i C- završetku. Na svaki reznj može se vezati jedan metalni ion poput željeza, galija, aluminijska, cinka ili kadmija. Ukoliko je pH vrijednost niska afinitet transferina prema željezu se smanjuje. Transferin isporučuje željezo iz apsorpcijskih centara u dvanaesniku i makrofagima bijelih krvnih stanica u sva tkiva. (54)

Poznate su četiri linije obrane antioksidansa. U prvoj liniji obrane poznata su tri enzima: katalaza, superoksid dismutaza i glutacion peroksidaza. Oni dismutiraju superoksidni radikal, razgrađuju vodikove peroksidi i hidroperoksidi na bezopasne molekule (alkohole, kisik). Askorbinska kiselina, glutacion, mokraćna kiselina i alfa tokoferol spadaju u drugu liniju obrane. Oni neutraliziraju ili uklanjaju slobodne radikale dajući im elektron, a oni sami postaju slobodni radikali, ali imaju manje štetne učinke. Treća skupina ili skupina koja djeluje nakon što dođe do oštećenja biomolekula obnavlja DNA, bjelančevine i lipide. Prepoznaju, razgrađuju i uklanjaju oksidirane ili oštećene proteine, DNA i lipide kako bi spriječili nagomilavanje koje može biti toksično. Antioksidansi treće linije obrane su polimeraze, glikozilaze, nukleaze, proteinaze, proteaze i peptidaze. Posljednja, četvrta linija obrane, uključuje mehanizam prilagodbe u kojem koriste signale za proizvodnju slobodnih radikala i reakciju da spriječe djelovanje slobodnih radikala. (55)

Postoji više strategija antioksidansa:

- pokušaj smanjenja proizvodnje slobodnih radikala smanjenjem dostupnosti kisika, smanjenjem aktivnosti enzima koji su odgovorni za proizvodnju ROS-a i zadržavanjem željeza i bakra u proteinima
- održavanje integriteta mitohondrija koji su glavni izvor slobodnih radikala u biološkom sustavu
- uklanjanje slobodnih radikala i detoksikacija ili raspadanje slobodnih radikala i toksičnih produkata
- recikliranje vitamina E koji može pomoći u održavanju antioksidacijske sposobnosti
- redoks signalizacija, faktor transkripcije i dodatna sinteza zaštitnih molekula koje imaju antioksidacijske i detoksikacijske aktivnosti glavni su elementi u borbi protiv stresa
- apoptoza, autofagija i ostali procesi koji se bave krajnje oštećenim stanicama sprječavaju da se oštećenje prenese na ostale stanice i tkiva te čine obrambenu mrežu borbe antioksidansa. (56)

#### **1.4. Enzimi**

Enzimi su globularni proteini tercijarne ili kvarterne strukture koji imaju svojstvo ubrzavanja kemijskih reakcija, tj. katalitičko djelovanje, pri čemu ostaju nepromijenjeni. Aktivni su u organizmima koji žive na 0 °C ili pri 100 °C, a kod ljudi pri 37 °C. Ubrzavaju specifičnu reakciju i preko milijun puta. Da bi uopće došlo do neke kemijske reakcije potrebno je supstrati nadvladaju energiju aktivacije i da se sudare sa supstratom, a upravo enzimi smanjuju energiju aktivacije i samim time ubrzavaju reakciju. Često enzimi kataliziraju samo jednu vrstu kemijske reakcije, a ponekad i skup kemijski srodnih reakcija. Da bi se postigla katalitička moć enzima potrebno je udružiti proteinski dio enzima (apoenzim) s neproteinskim dijelom enzima (kofaktor) čime nastaje aktivni oblik (holoenzim). Enzimi su vrlo selektivni katalizatori, a ta selektivnost proizlazi iz odnosa enzim - supstrat, koji se opisuje mehanizmom ključ - brava. Aktivnost enzima se mijenja ovisno o uvjetima u njegovom okolišu, od kojih su najvažniji koncentracija supstrata, pH i temperatura. (1)

### 1.4.1 Kinetika enzimom kataliziranih kemijskih reakcija

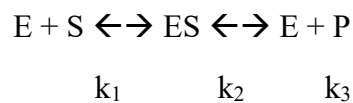
Supstrati se vežu za aktivno mjesto pri čemu enzim mijenja oblik i njegovo aktivno mjesto prihvati supstrat. Pri tome dolazi do nastajanja vodikovih i ionskih veza u aktivnom mjestu. Aktivno mjesto može smanjiti energiju aktivacije i brzinu reakcije, a supstrati se prevode u produkte koji se potom oslobađaju i aktivno mjesto se oslobađa za dvije nove molekule supstrata. (57) Aktivno mjesto nastaje nabiranjem malobrojnih aminokiselinskih ostataka iz različitih dijelova primarne strukture. Sva aktivna mjesta enzima imaju neke zajedničke karakteristike poput strukture ždrijela ili udubljenja, gdje interakcijom enzima i supstrata dolazi do prijelaznog stanja supstrata. Kod aktivnog mjesta nastaje jedinstven mikro-okoliš koji omogućava nastanak i razgradnju prijelaznog stanja. U aktivna mjesta supstrati se vežu nekovalentnim, a ponekad i kovalentnim vezama, a specifičnost vezanja supstrata u aktivno mjesto ovisi o preciznom rasporedu atoma u aktivnom mjestu. (58)

Enzimi su, također, katalizatori unutar bioloških sustava pa ih nazivamo i biokatalizatorima. Kao biokatalizatori predstavljani su 1833. godine otkrićem konverzije škroba u šećer uz djelovanje diastazom. (59) Enzimi su izvanredan molekularni stroj koji određuje obrasce kemijskih transformacija i posreduje pretvaranju jednog oblika energije u drugi. Katalitička aktivnost enzima prisutna je i kod fotosinteze gdje se svjetlosna energija pretvara u energiju kemijske veze, kao i kod staničnog disanja, gdje se slobodna energija sadržana u organskim molekulama pretvara u slobodnu energiju ionskog gradijenta, a zatim u slobodnu energiju adenozin trifosfata (ATP). Enzimi igraju ključnu ulogu pri reakcijama fotosinteze i staničnog disanja, a drugi enzimi koriste energiju adenozin trifosfata (ATP) koja se oslobađa za druge reakcije koje obavljaju. Četvrtina gena u ljudskom genomu kodira enzime, što svjedoči o njihovoj važnosti za život. Gotovo svi enzimi su proteini. Proteini su učinkoviti katalizatori za raznolikost kemijskih reakcija jer zbog svog kapaciteta specifično vežu širok raspon molekula. Najvažnije karakteristike enzima su katalitička snaga i specifičnost. Oni kataliziraju reakcije stabilizacijom prijelaznih stanja. (60)

Prema *International Union of Biochemistry* enzimi se mogu podijeliti prema tipu reakcije koje kataliziraju u šest osnovnih skupina:

- oksidoreduktaze – reduciraju ili oksidiraju supstrate transferom elektrona ili atoma vodika uz kisik
- transferaze - kataliziraju premještanje funkcionalnih skupina sa supstrata (donor) na akceptorske molekule (ne uključujući vodu)
- hidrolaze – skupina enzima koja uključuje vodu za nastanak produkata
- liaze - uklanjaju ili vežu supstituente na supstrat
- izomeraze – uzrokuju izomerizaciju supstrata
- ligaze – kataliziraju kovalentno vezanje dviju molekula (2,61)

Znanstvenici Michaelis i Menten početkom 20. stoljeća analizirali su kinetiku enzimskih reakcija na temelju jednostavnih pretpostavki da supstrat (S) može biti preveden u produkt (P) ukoliko dođe u dodir sa supstratom (S) pri čemu nastaje kompleks enzim – supstrat (ES).



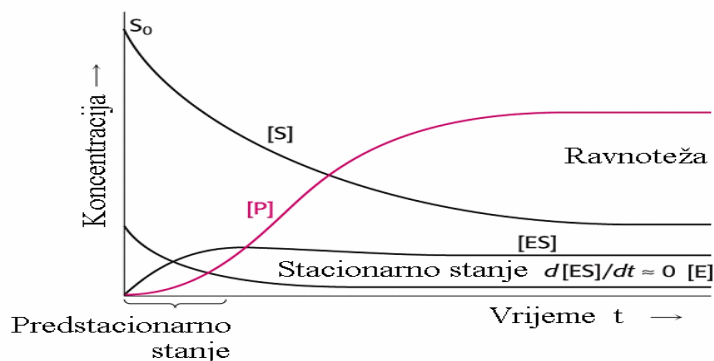
E = enzim

S = supstrat

ES = međuprodukt

k = konstanta brzine

Međuprodukt se može raspasti ponovno na reaktante, E i S, ili može tvoriti produkt. Brzinu nastajanja produkta predstavlja konstanta brzine  $k_1$ , a brzinu raspadanja ES na E + S predstavlja  $k_2$ . Prva dva procesa nazivaju se pred-ravnoteža jer je to kemijska reakcija koja prethodi nastajanju produkta.



Slika 4. Pregled predravnoteže (1)

Brzina enzimskih reakcija može se izraziti preko količine supstrata pomijenjenog u jedinici vremena ili preko količine stvorenog produkta u jedinici vremena. (1)

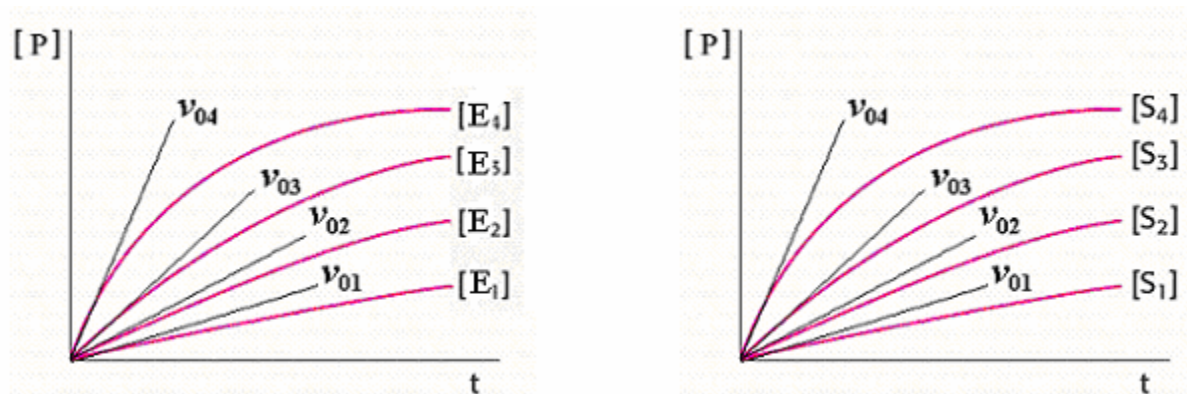
$$v = -d(S) / dt = d(P) / dt$$

Brzina reakcije ovisi o :

- koncentraciji enzima
- koncentraciji supstrata
- afinitetu enzima za supstrat

Reakcije kod kojih je brzina direktno proporcionalna koncentraciji reaktanta nazivaju se reakcije prvog reda uz odgovarajuću jednadžbu  $2A \rightarrow P$  i pripadajuću formulu za brzinu  $v = k \times A^2$ . Reakcije koje uključuju dva reaktanta nazivaju se reakcijama drugog reda uz jednadžbu  $A + B \rightarrow P$  i pripadajuću reakciju  $v = k \times (A) \times (B)$ . U slučaju nultog reda reakcije, reakcija ne ovisi o koncentraciji reaktanata.

Ako se koncentracija enzima ne povećava, a koncentracija supstrata povećava, početna brzina enzimske reakcije raste s porastom koncentracije supstrata. S obzirom da brzina reakcije ovisi o koncentraciji enzima, ako koncentracija supstrata ostane konstantna, brzina reakcije povećavat će se s porastom koncentracije enzima.



Slika 5. Ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji enzima i koncentraciji supstrata (1)

Na brzinu enzimskih reakcija utječu:

- temperatura
- pH vrijednost
- ionska jakost

Znanstvenici Michaelis i Menten ustanovili su da je kod ispitivanja enzima neophodna kontrola temperature i pH vrijednosti. Pod utjecajem promjene pH vrijednosti, aktivnost enzima raste do točke maksimuma, a nakon toga se primjećuje pad aktivnosti enzima. Izbor temperature izuzetno je važan s obzirom na to da enzimi djeluju specifično pri određenim temperaturama. Povećanjem temperature enzimska reaktivnost raste do određene točke nakon čega se, pri visokoj temperaturi, nazire denaturacija proteina gdje dolazi do nepovratnog gubitka svojstava. Većina enzima koji su proučavani s obzirom na strukturu i mehanizam imaju temperaturni optimum pri kojem djeluju. (62)

#### 1.4.2. Enzimi u prehrambenoj industriji

Enzimi se koriste i u prehrambenoj industriji gdje mogu izazvati poželjne ili nepoželjne reakcije. Enzimi djeluju tijekom prerade i čuvanja hrane. Poželjne reakcije u prehrambenoj industriji postižu se adekvatnom kontrolom temperature i u tu skupinu spadaju: zgrušavanje mlijeka (renin, kimozin), zrenje sira (proteaze, esteraze – lipaze), dozrijevanje voća (pektolitički enzimi) te omekšavanje i zrenje mesa (proteolitički enzimi). Nepoželjne promjene događaju se zbog inaktivacije enzima i tu spadaju: posmeđivanje voća (polifenol oksidaze) i stvaranje neugodnih mirisa (lipaze, lipoksigenaze). (2) Oko šezdeset različitih enzima endogenog i egzogenog porijekla



nalaze se u mlijeku. Endogeni enzimi dolaze iz mliječnih žlijezda, a egzogeni iz mikroorganizama. Najznačajniji proteini u mlijeku su lipaze, fosfataze, peroksidaze, katalaze i reduktaze. U jajima je najpoznatiji protein lizozim koji je poznat pod nazivom „antibiotik tijela“ jer ubija razne mikroorganizme. U bjelanjku jajeta nalazi se katalaza, pekarskim proizvodima amilaze, hemicelulaze i lipaze, a u voću i povrću su najpoznatiji pektolitički proteini, celulaze i hemicelulaze. (63)

### **1.5. Katalaza**

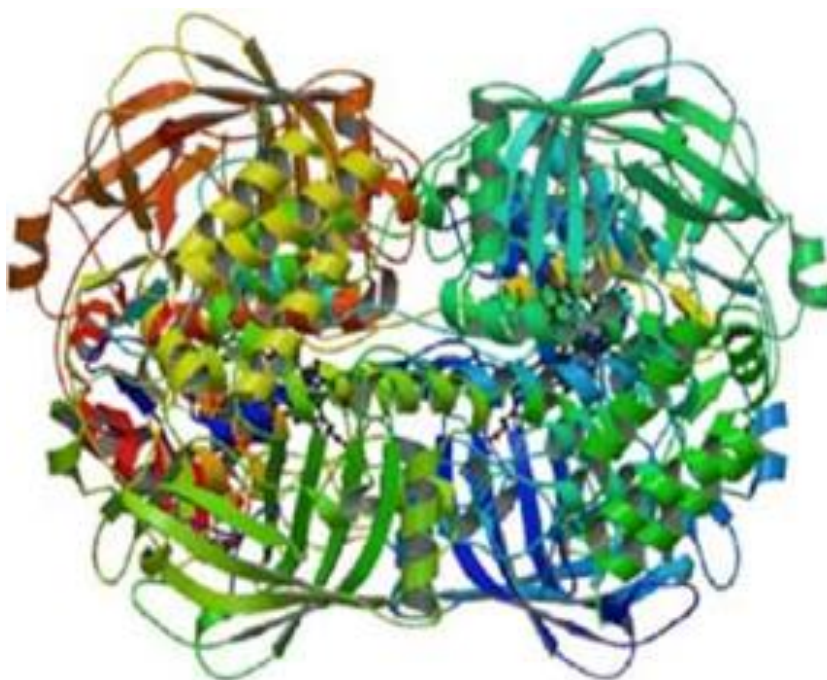
Katalazu možemo naći u svim aerobnim organizmima. Glavna funkcija joj je antioksidativna. Obično se nalazi u staničnim organemila zvanim peroksisomi. Jedan je od prvih enzima koji je izoliran sa visokim stupnjem čistoće, a njezina kristalizacija iz ekstrakta goveđe jetre smatra se jednim od prvih značajnijih uspjeha biokemije. (4) Katalaza djeluje kao agens u borbi protiv reaktivnih kisikovih spojeva i razgrađuje vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) u vodu ( $H_2O$ ) i kisik ( $O_2$ ), te hidrolizira preko milijun molekula supstrata ( $H_2O_2$ ) u sekundi. Neki organizmi proizvode katalazu kako bi se obranili od vodikovog peroksida. (64) Katalaza se nalazi u gotovo svim organizmima, počevši od mikroorganizama, biljaka, životinja pa do čovjeka. Kod čovjeka je posebno zastupljena u jetri i crvenim krvnim zrnima, eritrocitima. Optimalni pH na kojem djeluje katalaza je između 4 i 11, a kod čovjeka je optimalni pH 7 i temperatura 37 °C. Pokazuje iznimnu toplinsku stabilnost što je iznenađujuće za homotetramere stabilizirane nekovalentnim interakcijama. U istraživanjima se pokazalo da se podjedinice isprepleću pa pružaju poboljšanu toplinsku stabilnost. (50)

Katalaza se koristi u biotehničkim područjima, osobito u bioremedijaciji gdje pokazuje razgradnju ugljikovodika u tlu zagađenom sirovom naftom. Kod bioremedijacije vodikov peroksid se koristi kao izvor kisika u aerobnim uvjetima jer dolazi do raspadanja vodikovog peroksida u vodu i kisik. Također se koristi u prehrambenoj industriji, osobito u proizvodnji sira, mlijeka i proizvodnji omotača za hranu te u tekstilnoj proizvodnji gdje iz otpadnih voda uklanja štetni vodikov peroksid. (4)

Manjak ili neispravnost katalaze povezan je s mnogim bolestima kao što su dijabetes, vitiligo, dermatitis, neurodegenerativne bolesti, bipolarni poremećaji, anemija, hipertenzija i slično. Ima potencijal da bude lijek, ali potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo da se može koristiti kao lijek. (65)

### 1.5.1. Struktura i raspodjela u različitim organizmima

Katalaza je tetramer sastavljen od četiri polipeptidna lanca od kojih je svaki sastavljen od petsto aminokiselina. Sadrži četiri porfirinske hem skupine u feritnom stanju koje omogućavaju da enzim reagira s vodikovim peroksidom. Hem nije skupina bitna samo za katalizu i biološku aktivnost, nego je to skupina bitna i za prijenos elektrona. (50) Hem je prostetička skupina koja se sastoji od atoma željeza smještenog u centru velikog heterocikličkog organskog prstena porfirina. Upravo je hem skupina odgovorna za katalitičko djelovanje enzima. (66) Pristup hemu je kroz duge kanale koji povezuju molekularnu površinu do aktivnog mjesta. Novija istraživanja dokazala su da goveđa ljudska katalaza sadrži i četiri čvrsto vezane molekule nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) koji nije esencijalan za aktivnost katalaze. Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) smanjuje osjetljivost katalaze na inaktivaciju kada je enzim izložen niskim koncentracijama otrovne supstance,  $H_2O_2$ . (67)



*Slika 6. Prikaz kvarterne strukture katalaze (68)*

Raznolikost među katalazama koja je vidljiva u raznolikosti podjedinica, broju kvarternih struktura, hem prostetskih skupina omogućuje podjelu katalaza u četiri skupine:

- tip A = monofunkcionalni enzimi – pretežna aktivnost je dismutacija vodikovog peroksida
- tip B = katalaza – peroksidaze – osim peroksidativne aktivnosti pokazuje i katalitičku aktivnost
- tip C = nehemske katalaze – aktivnost je još pod raspravom
- tip D = razni proteini s manjom aktivnosti katalaze – utvrđeno je da ima peroksidatska i katalatska svojstva iznad pH 4 u odsutnosti kloridnog iona, odnosno organskog supstrata (69)

#### **TIP A – Monofunkcionalni enzimi**

Najveća i najopširnija skupina katalaza sastoji se od monofunkcionalnih enzima. Prevladavajuća im je aktivnost dismutacija vodikovog peroksida, a svaka peroksidatska aktivnost im je mala i ograničena na male supstrate. Podjela ove skupine temelji se na veličini podjedinice i sadržaju hema. Jedna skupina sadrži male podjedinice (55 – 69 kDa), a druga skupina sadrži velike podjedinice (75 – 84 kDa) koje imaju povezan hem d. (69) Monofunkcionalne hem katalaze prisutne su u životinjama, biljkama i mikroorganizmima. Imaju strukturu tetraedra sa četiri jednake podjedinice pri čemu svaka podjedinica sadrži molekulu hema. (66)

#### **TIP B – Katalaza - peroksidaza**

Katalaza – peroksidaze su druga najveća grupa koja pokazuje iznimno peroksidatsko djelovanje uz katalatsko. (69) Uglavnom se nalaze u aerobnim bakterijama te imaju molekulsku masu od 120 do 130 kDa. Bifunkcionalni su enzimi koji se pojavljuju u dimernom obliku i sadrže hem te kataliziraju peroksidnu reakciju koja uključuje primjenu organskog elektron – donora za redukciju spoja  $[\text{Fe(IV)=O}\dots\text{R}]$ . Reakcija se odvija kroz tri stupnja gdje prvo dolazi do oksidacije enzima molekulom vodikovog peroksida, zatim do redukcije  $[\text{Fe(IV)=O}\dots\text{R}]^{\ast-}$  u spoj  $\text{Fe(IV)=O}\dots\text{R}$  i u konačnici do redukcije spoja  $\text{Fe(IV)=O}\dots\text{R}$  u početno stanje hem katalaze. (66)

## **TIP C – Nehemske katalaze**

Nehemska skupina je trenutno najmanja skupina jer postoje zasada samo tri nehemske katalaze koje su okarakterizirane, a katalitičko djelovanje još uvijek nije u potpunosti poznato. Sve tri spadaju u skupine životinjskog podrijetla. Umjesto aktivnog centra koji sadrži željezo, nehemske skupine sadrže mangan u centru. Upravo zbog toga su nehemske katalaze u početku nosile naziv pseudo - katalaze. (63) Molekulska masa im je u rasponu od 170 do 210 kDa. (66)

## **TIP D – Razni enzimi s manjom aktivnosti katalaze**

Četvrta, najmanja skupina katalaza, sastoji se od nekoliko vrsta hem katalaza poput kloroperoksidaza, bromoperoksidaza i katalaza - fenol oksidaza koje imaju slabo katalitičko djelovanje. Peroksidatska i katalatska svojstva ima iznad pH 4 u odsutnosti kloridnog iona, odnosno organskog supstrata. Da bi se mogle primjenjivati u industriji, katalaze moraju biti postojane u velikom rasponu temperatura i pH. Kloroperoksidaza iz *Caldariomyces fumago* pokazuje najveću reaktivnost kao katalaza, a katalaze fenol oksidaze se pojavljuju kao tetrameri sa sposobnosti oksidacije određenih spojeva na bazi fenola bez prisutnosti vodikovog peroksida. (66)

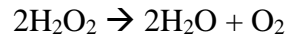
### **1.5.2. Funkcija katalaze**

Biološka funkcija katalaze je zaštita stanica od štetnog djelovanja vodikovog peroksida. Katalaza je enzimski antioksidans i razgrađuje vodikov peroksid u vodu i kisik što ukazuje na njezinu katalitičku aktivnost. Tako se sprječava razvoj raznih bolesti i oštećenja molekularnih stanica. Katalaza ima ulogu oksidacije H donora, npr. metanola, etanola, mravlje kiseline ili fenola, uz utošak 1 mola peroksida. To predstavlja peroksidnu aktivnost. (70)

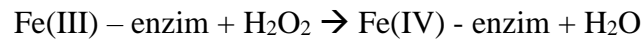
### **1.5.3. Kemijska reakcija i molekularni mehanizam**

Aktivna vrsta odgovorna za reakcije oksidacije kod enzima katalaze je visokovalentni međuprodukt željeza koji je poznat kao spoj I. Spoj I dobiven je reakcijom s vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ). Kada spoj I nastane, brzo reagira s drugom molekulom vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ). (71)

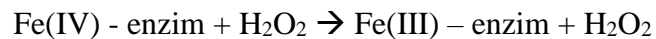
Vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) nastaje izravno iz superoksida ( $\text{O}_2$ ) brzom reakcijom dismutacije koja se može dogoditi spontano ili enzimski s superoksidnim dismutazama (SOD). Iz toga proizlazi da se vodikov peroksid stvara gdje god ima kisika. (66)



Katalaza djeluje s vodikovim peroksidom u dvije reakcije. Specifično je da obje reakcije ovise o katalazi. U prvoj reakciji feritni ion reagira s vodikovim peroksidom pri čemu nastaje voda i enzim supstrat (ES). U drugoj reakciji spoj I se kombinira s drugom molekulom vodikovog peroksida da bi se regenerirali željezni ion, voda i kisik. Oksidacija elektron donora, koji je u ovom slučaju vodikov peroksid, vraća Fe(IV) u Fe(III). Konstanta brzine za prvu reakciju je  $k_1$ , a za drugu reakciju je  $k_2$ . Obrnute reakcije se zanemaruju. (69)

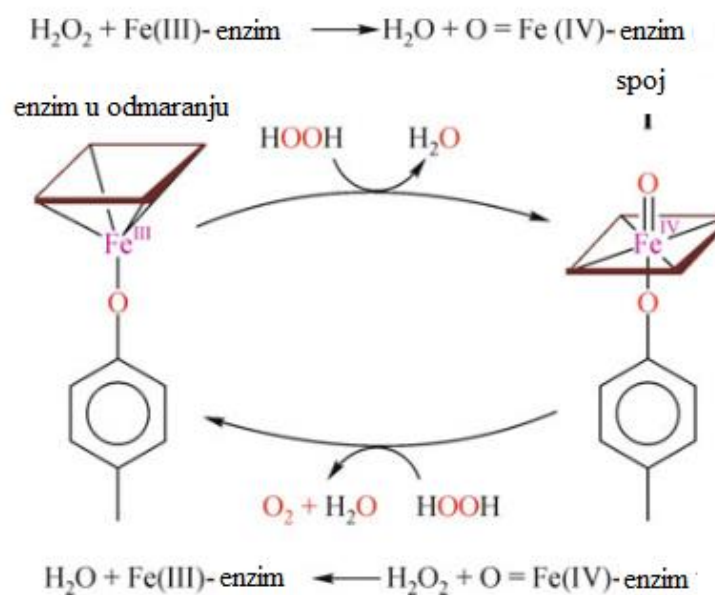


Spoj I



Spoj I

Jedan od protona molekule vodikovog peroksida uklanja se s jednog kraja molekule i postavlja na drugi kraj i to djelovanje polarizira i prekida O – O vezu u vodikovom peroksidu. Kada spoj I reagira s drugom molekulom vodikovog peroksida, vodikov peroksid tada predstavlja donora elektrona. Donor elektrona vraća spoj I u početno stanje, odnosno u Fe(III).



Slika 7. Mehanizam djelovanja katalaze (71)

Testiranja aktivnost katalaze u prisutnosti inhibitora kao što je boroksin, može smanjiti aktivnost katalaze. Inhibitor povećava energiju aktivacije katalaze tako da enzim postane manje učinkovit i utječe na pH vrijednost pri kojoj katalaza djeluje. Bez prisutnosti inhibitora, katalaza najbolje djeluje pri pH vrijednosti 7.1, a u prisutnosti inhibitora djeluje pri pH vrijednosti 6.2. Iz toga se uočava da prisutnost inhibitora utječe na katalazu mijenjajući stanje ionizacije na aktivnim mjestima enzima. (72)

#### **1.5.4. Klinički značaj i primjena**

Tijekom upalnih procesa oksidansi se oslobađaju iz stanica domaćina i mogu razgraditi bakterijske komponente, kao i komponente okolnih tkiva. (73) Suprotno tome, stanice domaćina oslobađaju enzime, poput katalaze, koji mogu razgraditi oksidirajuća sredstva da bi se izbjeglo uništavanje tkiva. Katalaza sudjeluje u razgradnji vodikovog peroksida dajući vodu i kisik te se zbog toga smatra obrambenim enzimom protiv štetnih učinaka vodikovog peroksida. (74)

Bakterije su zbog stalnih napada reaktivnih kisikovih vrsta razvile sposobnost obrane od reaktivnih kisikovih vrsta kako bi se mogle nesmetano razmnožavati i boraviti u stanicama domaćina. Da bi se obranile od oksidativnih stresora, koriste antioksidativne enzime poput katalaze i katalaze – peroksidaze. Razgradnja ROS-a pruža povoljne uvjete u kojima bakterijski patogeni poput *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila* i *Neisseria meningitidis* mogu podnijeti izloženost visoko reaktivnih molekulama i preživjeti. (75) Katalaza se nalazi i u bakterijama *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Listeria* koje pridonose razvoju bolesti koje se prenose hranom.

Za identifikaciju bakterija koristi se katalaza test, jedan od tri glavna testa. Prisustvo enzima katalaze otkriva se upotrebom vodikovog peroksida. Bakterije koje su pozitivne na katalazu stvaraju mjehuriće zbog razlaganja vodikovog peroksida na vodu i kisik. (76)

Katalaza je povezana i s pojmom sijede kose. Proces sijedenja uzrokuje nakupljanje vodikovog peroksida zbog trošenja i oštećenja folikula. Vodikov peroksid je prisutan u kosi, ali u malim količinama. Starenjem se količina vodikovog peroksida povećava pa kosa postaje siva te u konačnici bijela. Zbog vodikovog peroksida onemogućava se normalna sinteza melanina, prirodnog pigmenta kose. Znanstvenici su došli do otkrića

da je uzrok nakupljanja vodikovog peroksida nedostatak enzima katalaze jer je katalaza zaslužna za razgradnju vodikovog peroksida na vodu i kisik. (77)

Enzim katalaza pročišćena je u kristalnom obliku iz raznih izvora životinjskog porijekla. Znanstvenici su dugo zapostavljali katalazu iz biljnih vrsta zbog siromaštva u biljnim vrstama i nestabilnosti ekstrahiranih otopina. (78) Biljna katalaza izolirana je iz nekoliko izvora, odnosno lišća špinata, lišća leća i kotiledona krastavca. (79) Katalaza se javlja u medu gdje potječe izravno od peludi. Budući da katalaza kod meda potječe iz peludi, može se djelotvorno odrediti količina peroksida. Količina peroksida ovisi o tome koliko peludi pčele skupe i o aktivnosti katalaze tog peluda. (80)

## **2. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **2.1. Metode određivanja katalaze**

Do danas je opisano nekoliko metoda za mjerenje aktivnosti katalaze. Jedan od najjednostavnijih kvalitativnih postupaka uključuje određivanje prisutnosti enzima katalaze u bakterijama uporabom vodikovog peroksida koji se razgrađuje do kisika. Bakterije koje su katalaza pozitivne stvaraju mjehuriće zbog oslobađanja kisika. Kvantitativna mjerenja uključuju kolorimetrijski i spektrofotometrijski test. Prisutna su ograničenja poput glomaznih postupaka i visokih troškova. (71)

Kolorimetrijska analiza zasniva se na mjerenju hidrogenperoksidnog supstrata koji je zaostao nakon djelovanja katalaze. Katalaza pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik (katalitički put), a zatim se reakcija zaustavlja s natrij azidom. Tada se alikvot reakcijske smjese analizira za određivanje zaostalog vodikovog peroksida kolorimetrijskom analizom. U kolorimetrijskoj analizi koristi se supstituirani fenol koji se oksidativno spaja s 4-aminoantipirinom dajući crvenu boju. Aktivnost katalaze mjeri se pri razblaženoj koncentraciji vodikovog peroksida tako da ne dođe do inaktivacije enzima. (81)

Određivanje aktivnosti katalaze najčešće se provodi kontinuiranim UV spektrofotometrijskim testom koji se temelji na praćenju sniženja apsorbancije reakcijske smjese pri 240 nm (UV - područje). Ako se vodikov peroksid razgradi, rezultat pokazuje maksimum apsorbancije, tj. 240 nm. (73) UV spektrofotometrijska metoda omogućava spektrofotometrijsko praćenje opadanja vodikovog peroksida na 240 nm kinetičkim programom. Analiza se provodi vrlo kratko (30 sekundi) i pri sobnoj temperaturi. (69)

#### **2.1.1. Manometrijsko određivanje aktivnosti katalaze**

Za manometrijsko određivanje aktivnosti katalaze koristi se katalaza izolirana iz goveđe jetre. Osnovna otopina u kojoj djeluje katalaza, pripremi se otapanjem 2 mg čiste katalaze u 1 mL fosfatnog pufera, odnosno monokalijeveg fosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) i dinatrijevog fosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ). Otopina vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pripravi se iz 13 ml 30%-tnog  $\text{H}_2\text{O}_2$  koji je dodan u 100 mL destilirane vode, a otopina s puferom pripremi se od 100 mL 0,05 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 150 mL 0,063 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  koji se dodaju u 250 mL destilirane vode.



Manometarska metoda koristi se za nadzor enzimske reakcije, a oslobođeni kisik mjeri se u aparatu pri temperaturi od 37°C i uz konstantno miješanje. Reakcijski volumen od 25 mL koji sadrži puferску otopinu uz konstantu količinu katalaze je termostat. Na koji se unosi određena količina H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kako bi se mjerilo nastajanje kisika. S obzirom da na brzinu enzimske reakcije utječu pH vrijednost, inhibitori, koncentracija supstrata i temperatura, moguće je izmjeriti enzimske parametre korištenjem poznatih jednadžbi za kinetiku enzimskih reakcija. (72)

### **2.1.2. Kolorimetrijsko određivanje aktivnosti katalaze**

U kolorimetrijskoj metodi određivanja katalaze koristi se spektrofotometar, kiveta, analitička vaga, ultračista voda i čaša od 250 mL. U svim dijelovima procesa potrebno je koristiti ultračistu vodu te otopine supstrata i pufera čuvati na sobnoj temperaturi, a otopine enzima pri temperaturi od 4°C. Potrebno je razrijediti 2 mL kalijevog fosfata deset puta u 20 mL vode. Za otopinu katalaze potrebno je izvagati 1 mg krute katalaze i otopiti u 1,45 mL pufera. Otopina katalaze može se čuvati dva tjedna na 4°C.

Kalijev fosfatni pufer ima pH vrijednost 7. Sadrži 0,25 mM 4-aminoantipirina i 2 mM 3,5-dikloro-2-hidroksibenzensulfonske kiseline. Potrebno je pripremiti 200 mL otopine kromogena i pomiješati 60 mL pufera sa 140 mL vode u čaši od 250 mL. Zatim se doda 10 mL razrijeđenog pufera u bočicu s kromogenim reagensom i miješa se dok se ne otopi. Otopina iz bočice prenese se u čašu s puferom i dobro promiješa te podijeli na alikvote i čuva na -20°C.

Reagens u boji koji se koristi u kolorimetrijskoj metodi određivanja katalaze može se držati tri dana na 4°C. Prije upotrebe potrebno je pripremiti reagens za boje dodavanjem 30 mL otopine katalaze u svakih 30 mL kromogena.

Svaki dan potrebno je pripremiti slijepu probu. U epruvetu se stavi katalaza i snažno miješa da se dobije homogena suspenzija te se odmah ukloni 20 mL suspenzije. Enzimske suspenzije potrebno je razrijediti deset tisuća puta i upotrijebiti 2 – 5 mL od svakog razrjeđenja po reakciji.

Kolorimetrijska suspenzija supstrata je 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Koncentracija 3%-tnog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kreće se u rasponu od 3-4% pa je potrebno spektrofotometrijski odrediti točnu koncentraciju i korigirati na 200 mM prije upotrebe. Da bi se odredila koncentracija otopine supstrata, potrebno je razrijediti 50 mL pripremljene otopine s puferom. Stvarna

koncentracija odredi se UV apsorbancijom mjerenjem apsorbancije na 240 nm, a stvarna koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  odredi se pomoću Beerovog zakona.

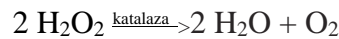
Otopina 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  služi za dobivanje krivulje apsorbancije crvene kinon – iminske boje prema koncentraciji  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Potrebno je razrijediti 200  $\mu\text{L}$  standardizirane otopine supstrata za kolorimetrijsku analizu na 4 mL s puferom. Otopina se može čuvati na 4°C šest dana. Priprema volumena dovoljnog za dvadeset UV analiza priprema se tako da se razrijedi 200  $\mu\text{L}$  3%-tnog  $\text{H}_2\text{O}_2$  na 10 mL s puferom, odredi se stvarna koncentracija spektrofotometrijski i prilagodi se konačna koncentracija otopine supstrata za UV analizu na točno 20 mM s puferom. Konačna koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  u ispitivanoj smjesi je 10 mM.

Kada se sve otopine pripreme, u epruvete za mikrocentrifugu se dodaju otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,125 mL, 250 mL; 500 mL i 750 mL) i do 1 mL se dodaje pufer. Alikvot od 10 mL svake otopine prenese se u drugu epruvetu i doda se 1 mL reagensa u boji te se pričeka petnaest minuti i očita apsorbancija na 520 nm. Na osnovu rezultata nacrtaju se standardna krivulja apsorbancije na 520 nm u odnosu na količinu  $\text{H}_2\text{O}_2$  u reakcijskoj smjesi. (81)

### 3. RASPRAVA

#### 3.1. Uloga katalaze u stanicima

Sve životinjske stanice i mnoge biljne stanice sadrže peroksisome, sferne organele promjera 0,2 – 1,0 μm. Peroksisomi sadrže nekoliko enzima oksidaze koji molekularni kisik koriste za oksidaciju organskih tvari, pri čemu nastaje vodikov peroksid, visoko citotoksični metabolit. Peroksisomi, također, sadrže obilne količine enzima katalaze koji razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik.



U većini eukariotskih stanica, peroksisom je glavna organela u kojoj se oksidiraju masne kiseline stvarajući preteče za važne biosintetske puteve. Razne toksične molekule u jetri i bubrezima razgrađuju se u peroksisomima stvarajući bezopasne produkte.

Peroksisomima nedostaje dišni lanac pa se elektroni, nastali tijekom oksidacije masnih kiselina, direktno prenose na kisik stvarajući vodikov peroksid. Nedostaje im i ciklus limunske kiseline pa se acetil CoA, koji je stvoren tijekom razgradnje masnih kiselina, ne može dalje oksidirati i prenosi se u citosol gdje se upotrebljava za daljnju sintezu kolesterola i drugih metabolita. (82)

Peroksisomi su glavna mjesta unutarstanične proizvodnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kao rezultat oksidativnog tipa metabolizma. Vodikov peroksid u peroksisomima nastaje razgradnjom alkohola, fenola, mravlje kiseline i formaldehida. Osim proizvodnje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroksisomi su poznati po tome da stvaraju superoksidne radikale. Peroksisomi sadrže enzimске i ne-enzimске antioksidanse koji u normalnim uvjetima mogu ukloniti višak proizvedenih oksidansa i tako izbjeći oštećenja biomolekula. Prisutnost katalaze u peroksisomima poznata je još od karakterizacije organela u tkivima sisavaca i omogućava održavanje redoks homeostaze u stanicama. (83)

Katalaza koristi vodikov peroksid koji generiraju drugi enzimi u organelama za oksidaciju raznih supstrata poput fenola, mravlje kiseline, formaldehida i alkohola procesom peroksidacije. Proces peroksidacije je posebno važan u stanicama jetre i bubrega gdje detoksiciraju toksične molekule koje odlaze u krvotok. (84)

Aktivnost katalaze u stanicima mjerila se u hepatocitima štakora uz dodatak vodikovog peroksida u anaerobnim uvjetima. Pri tome se mjerila količina kisika koji nastaje. Vodikov peroksid bio je dodan u štakora pomoću infuzije ili injekcije, a omogućava

mjerenje nastanka kisika na vrlo osjetljiv način pomoću Clarkove elektrode koja omogućava amperometrijsko mjerenje aktiviteta otopljenog kisika.

Katalaza je veoma aktivan enzim koji milijun molekula vodikovog peroksida pretvara u vodu i kisik svake sekunde. Vodikov peroksid spada, uz superoksidne anione i hidroksilne ione, u slobodne radikale kisika koji u svojoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Slobodni elektroni uzrokuju davanje ili oduzimanje elektrona molekulama i upravo to ih čini reaktivnima te uzrokuju oksidativni stres. (69)

Katalaza zajedno s glutation peroksidazom (GPX) i peroksiredoksinom (PRX) igra ključnu ulogu u snižavanju i stabilizaciji vodikovog peroksida. Tako se omogućava održavanje homeostaze stanica sisavaca i prilagođava se stresu. Peroksiredoksin i glutation peroksidaza su odgovorni za eliminaciju niskih koncentracija vodikovog peroksida, a katalaza je efikasnija pri višim koncentracijama vodikovog peroksida. Utvrđeno je da je katalaza pod djelovanjem UVB svjetla odgovorna za stvaranje slobodnih radikala, pretežno hidroperoksida. Pod normalnim antioksidacijskim uvjetima katalaza štiti DNA od svjetlosti, a ROS koji nastaju detoksificiraju antioksidansnim enzimima koji su prisutni u stanicama. Ukoliko se stanični antioksidanski potencijal smanji, nakupljanje ROS-a posredstvom katalaze može dovesti do oštećenja DNA što može rezultirati pojavom raka. (80)

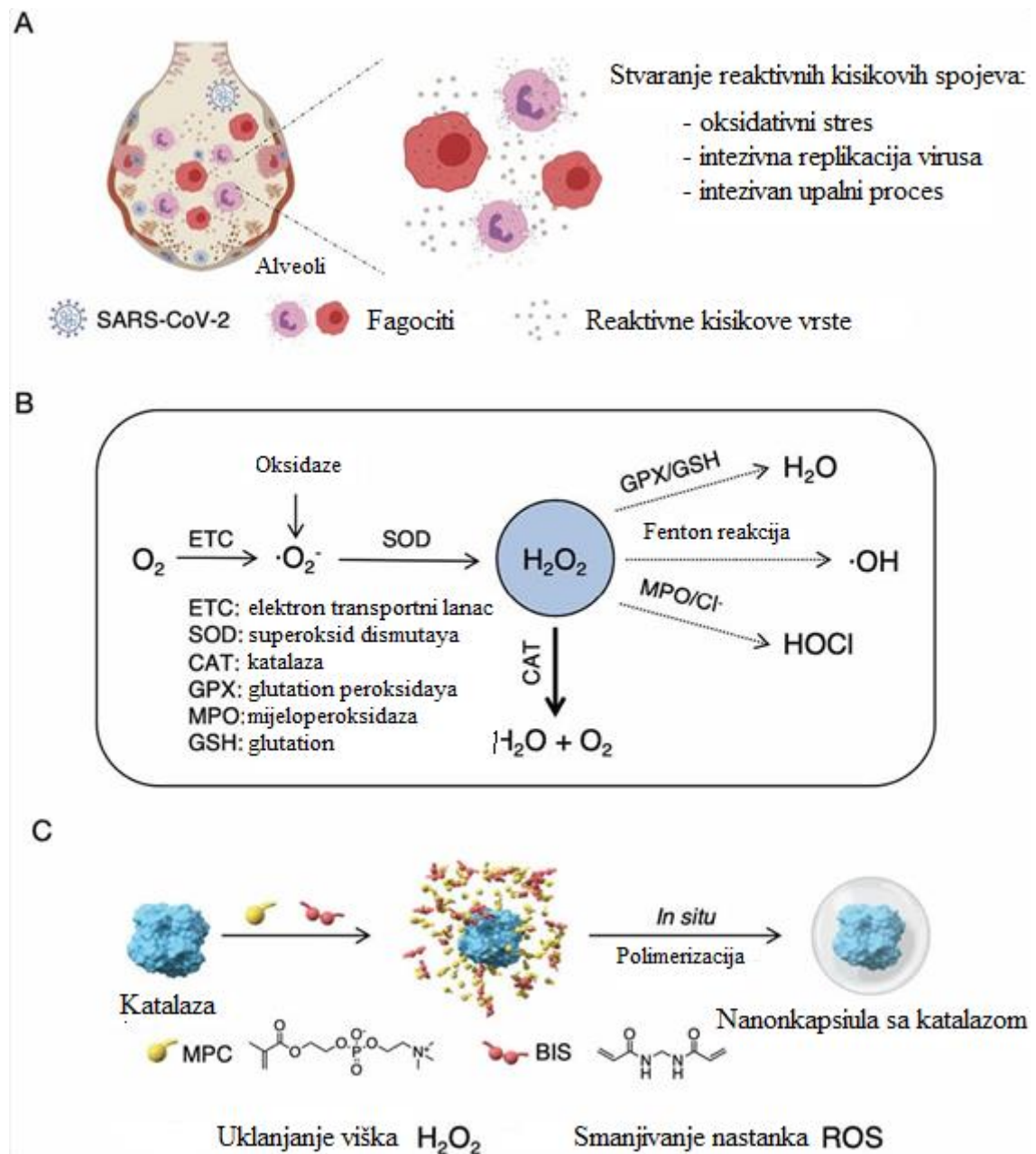
Ekspresija katalaze u srčanim mitohondrijima povećana je dijetom s visokim udjelom masti da bi se uklonio višak vodikovog peroksida koji je rezultat metabolizma lipida. Također, katalaza daje doprinos zaštiti mitohondrija od endogenih ili egzogenih izvora vodikovog peroksida. Istraživanje iz 1992. godine dokazalo je da je katalaza uglavnom prisutna u peroksisomima, ali također doprinosi razgradnji vodikovog peroksida na drugim mjestima poput mitohondrija i citosola gdje pomaže u borbi protiv oksidacijskog stresa.

Potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdila učinkovitost katalaze u djelovanju protiv raka. Tehnike kemijske modifikacije korištene su za kontrolu tkivne raspodjele katalaze, a učinkovitost isporuke katalaze dokazana je na životinjskim modelima za hepatičku ishemiju, ozljede tkiva i metastaze na jetri, plućima i ostalim organima. (85)

Pokazalo se da su reaktivne kisikove vrste otrovne, ali da djeluju i kao signalne molekule. Otpor tumorskih stanica na ROS signalizaciju ovisi o ekspresiji katalaze na staničnoj membrani. Signalizacija reaktivnih kisikovih vrsta može se obnoviti ako se

inhibira djelovanje katalaze i omogući opskrba vodikovog peroksida. Studije su pokazale da katalaza ima djelovanje u malignim stanicama i može smanjiti progresiju tumora moduliranjem staničnog redoks stanja. Pojačano antioksidativno djelovanje katalaze može zaštititi tumorske stanice od egzogenih oksidanata. (72)

Štetni ishod zaraze virusom COVID-19 povezan je s nedostatkom antioksidansa katalaze koja razgrađuje vodikov peroksid u vodu i kisik. Kako starimo, proizvodnja enzima katalaze prestaje i kao rezultat dolazi nakupljanje vodikovog peroksida u tijelu te uz *Streptococcus pneumoniae* dolazi do povećane smrtnost. (86)



Slika 8. Uloga katalaze u stanicama (87)

#### 4. ZAKLJUČAK

Svakodnevnim ubrzanom načinom života, povećanom fizičkom aktivnošću i izloženosti tvarima poput duhanskog dima, UV zračenja i sličnih utjecaja dolazi do pojave oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres nastaje zbog neravnoteže između reaktivnih kisikovih vrsta koje nastaju endogeno i egzogeno te antioksidansa koji mogu biti enzimski i neenzimski. Upravo egzogeni izvori reaktivnih kisikovih vrsta, odnosno cigarete, sunčeve zrake i izlaganje teškim metalima predstavljaju problem jer ih je teško izbjeći. Suprotnost reaktivnim kisikovim vrstama su antioksidansi koji sprječavaju oštećenja nastala oksidacijskim stresom. Tako se nastoji postići ravnoteža i izbjeći oksidacijski stres, odnosno bolesti i oštećenja stanica koje mogu nastati prilikom izlaganja izvorima reaktivnih kisikovih vrsta (rak, neurodegenerativne bolesti, dijabetes i sl.).

U ovom radu obrađena je katalaza, antioksidans prisutan u aerobnim organizmima. Pripada prvoj liniji obrane gdje razgrađuje superoksidni radikal, vodikove perokside i hidroperokside na alkohole i kisik, odnosno na molekule koje nisu opasne za zdravlje u umjerenim količinama. Katalaza štiti DNA od svjetlosti i mitohondrije od endogenih ili egzogenih izvora vodikovog peroksida. Potrebno je dodatno istražiti djelovanje katalaze na stanice raka da bi se mogla primijeniti kao lijek.

Uz antioksidanse, ukratko je obrađen i pojam hormeze, odnosno postupak kojim se postiže učinak na stanicu i organizam ukoliko se toksična tvar dodaje u malim količinama. Niske doze otrova pogoduju zdravlju, dok visoke doze otrova uništavaju zdravlje. Iz toga se može zaključiti da je sve, pa tako i toksične i netoksične tvari, potrebno konzumirati u umjerenim količinama da ne bi došlo do kontraefekta.

## 5. LITERATURA

1. M. Mattson, Hormesis defined, *Ageing Research Reviews*, 7(2008), 1-7
2. E.J. Calabres, L.A. Baldwin, Hormesis: The Dose-Response Revolution, *Environmental Health Sciences*, University of Massachusetts, Amherst, 43 (2003), 175-97
3. L. Mao, J. Franke, Hormesis in aging and neurodegeneration - a prodigy awaiting dissection, *International Journal of Molecular Sciences*, Germany, 14 (2013), 13109-13128, doi: <http://doi.org/10.3390/ijms140713109>
4. M. Miloš, Biokemija, Nastavni tekst za internu uporabu, KTF, 2019
5. J.M. deMan, *Principles of Food Chemistry*, Third edition, Ontario, 1999, 389-427
6. I. Fita, M. Rossmann, The active center of catalase, *Journal of Molecular Biology*, 185 (1985), 21-37, doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)9010-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)9010-9)
7. J. Kaushal, S. Mehandio, G. Singh, A. Ravina, S. Arya, Catalase enzyme: Application in Bioremediation and Food industry, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16 (2018), 192-199, doi: <http://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.035>
8. Dr.sc. N.Žarković, Institut Ruđer Bošković, Laboratorij za molekularnu biologiju <https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-molekularnu-medicinu/Laboratorij-za-oksidacijski-stres>
9. Oxidative Stress and ROS Signaling, Contact Technical Support (prezentacija)
10. V. Lushchak, Classification of oxidative stress based on its intensity, *EXCLI Journal*, 2014, doi: <https://doi.org/10.17877/DE290R-7035>
11. R. Gupta, A. Patel, N. Shah, A. Chandhary, U. Jha, U. Yadav, P. Gupta, U. Pakuwal, Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15 (2014), 4405-4409, doi: <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.11.4405>
12. S.A. Dalaen, A.I. Al-Qtaitat, Review Article: Oxidative Stress Versus Antioxidants, *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2 (2014), 60-71, doi: <https://doi.org/10.11648/j.bio.20140205.11>

13. E. Birben, U. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative stress and antioxidant defence, *World Allergy Organisation Journal*, 51 (2012), 9-19, doi: <https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>
14. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39 (2007), 44-84, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
15. H. Sies, On the History of Oxidative Stress: Concept and some aspects of current development, *Current Opinion in Toxicology*, 7 (2018), 122-126, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cotox.208.01.002>
16. C. Simioni, G. Zauli, A. Martelli, M. Vitale, G. Sacchetti, A. Gonelli, L. Neri, Oxidative stress: Role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging, *Oncotarget*, 9 (2019), 17181-17198, doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24729>
17. A. Phaniendra, D. Jestadi, L. Periyasanny, Free Radicals: Properties, Sources, Targets and their implication in various diseases, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30 (2014), 11-26, doi: <https://10.1007/s12291-014-0446-0>
18. S.A. Dalaen, A.I. Al-Qtaitat, Review Article: Oxidative Stress Versus Antioxidants, *American Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2 (2014), 60-71, doi: <https://doi.org/10.11648/j.bio.20140205.11>
19. A. Singh, R. Kukreti, L. Saso, S. Kukreti, Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases, *Molecules*, 24 (2019), 1583, doi: <https://doi.org/103390/molecules24081583>
20. P. Monaghan, N. Metcalfe, R. Torres, Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanism, measurements and interpretation, *Ecology Letters*, 12 (2009), 75-92, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1461-024.2008.01258.x>
21. Oxidative Stress and ROS Signaling, Contact Technical Support (prezentacija)
22. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *International*



Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39 (2007), 44-84, doi:  
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

23. G. Burton, E. Jauniaux, Oxidative stress, Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology, UK, 25 (2011), 287-299, doi:  
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>

24. M. Rinnerthaler, J. Bischof, M. Streubel, A. Trost, K. Richter, Oxidative stress in aging human skin, Biomolecules, Austrija, 5 (2015), 545-589, doi:  
<https://doi.org/10.3390/biom5020545>

25. L. Micheli, A. Smith, N. Bachl, C. Rolf, K.M. Chan, N. Dikić, Priručnik za klupske lekare, 2004, 81

26. M. Ott, V. Gogvadze, S. Orrenius, B. Zhivotovsky, Mitochondria, oxidative stress and cell death, Apoptosis, 12 (2007), 913-922, doi: <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>

27. H. Sies, Biochemistry of Oxidative stress, Angewandte Chemie International Edition in English, 25 (1986), 1058-1071, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.198610581>

28. E. Birben, U. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, O. Kalayci, Oxidative stress and antioxidant defence, World Allergy Organisation Journal, 51 (2012), 9-19, doi:  
<https://doi.org/10.1097/wox.0b013e3182439613>

29. A.C. Gašparović, N. Žarković, S.P. Bottari, Review for Themed Issue on Oxidative Toxicology: Role of ROS in Oxidative stress Biomarkers of nitro-oxidation and oxidative stress, Current Opinion in Toxicology, 2017

30. L. Štefan, T. Tepšić, T. Zavidic, M. Urukalo, D. Tota, R. Domitrović, Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice, Medicina, 43 (2007), 4-93

31. L. Sanders, J. Greenamyren, Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model, Free Radical Biology and Medicine, 62 (2013), 111-120, doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.003>

32. J. Klaurig, Oxidative stress and cancer, Current Pharmaceutical Design, 24 (2019), 4771-4778, doi: <https://doi.org/10.2174/1381612825666190215121712>

33. M. Schieber, N. Chandel, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Current Biology*, 24, 453-462, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
34. A. Tramutol, C. Lanzillotta, M. Perluigi, D. Allan Butterfield, Oxidative stress, Protein Modification and Alzheimer Disease, *Brain Research Bulletin*, 133 (2017). 88, doi: <https://doi.org/10.1016/j.branresbull.2016.06.005>
35. A. Nunomura, R. Castellani, X. Zhu, P. Moreira, G. Perry, M. Smith, Involvement of Oxidative stress in Alzheimer Disease, *Journal of Neuropathology, and Experimental Neurology*, 65 (2006), 631-641, doi: <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000228136.58062.b7>
36. P. Chikezie, O. Ojiako, A. Ogbuji, Oxidative Stress in Diabetes mellitus, *International Journal of Biological Chemistry*, 9 (2015), 92-109, doi: <https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.92.109>
37. M. Mattson, Hormesis defined, *Ageing Research Reviews*, 7 (2008), 1-7, doi: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.08.007>
38. E. Calabrese, G. Dhawan, R. Kapoor, I. Iavicoli, V. Calabrese, What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity, *Biogerontology*, 16 (2015), 693-707, doi: <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9601-0>
39. L. Mao, J. Franke, Hormesis in aging and neurodegeneration – A Prodigy Awaiting Dissection, *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (2013), 13109-13128, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms140713109>
40. URL: [http://banenestorovic.blogspot.com/2017/08/homeopatija-ii-deo\\_5.html](http://banenestorovic.blogspot.com/2017/08/homeopatija-ii-deo_5.html) (20.2.2020.)
41. B. Salehi, M. Martorell, J. Arbiser, A. Sureda, N. Martins, P. Maurya, M. Sharifi-Rad, P. Kumar, K. Sharifi-Rad, Antioxidants: Positive or negative actors?, *Biomolecules*, 2018, doi: <https://doi.org/10.3390/biom8040124>
42. O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54 (2018), 287-293, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

43. T.H. Quan, S.Benjakul, T.Sae-Ieaw, A.K. Balange, S. Maqsood, Protein – polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications, *Trend sin Food Science and Technology*, 91 (2019), 507-517, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.049>
44. A. Carr, S. Maggini, Vitamin C and Immune Function, *Nutrients*, 9 (2017), 1211
45. A. Rotondo Dottore, I. Ionni, F. Menconi, G. Casini, S. Sellari – Franceschini, M. Nardi, M. Marino, Antioxidant effects on beta – carotene, but not on retinol and vitamin E, in orbital fibroblasts from patients with Graves orbitopathy, *Journal of Endocrinological Investigation*, 41 (2017), 815-820, doi: <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0809-5>
46. R. Zhang, X. Wang, L. Ni, X. Di, B. Ma, S. Win, R.J. Reiter, COVID – 19: Melatonin as a potential adjuvant treatment, *Life Science*, 250 (2020), 117583, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ifs.2020.117583>
47. G. Lee, S. Han, The Role of Vitamin E in immunity *Nutrients*, 10 (2018), 1614, doi: <https://doi.org/10.3390/nu10111614>
48. Q. Li, Z. Sun, J. Li, Y. Zhang, Enhancing beta – carotene production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering, *FEMS Microbiology Letters*, 345 (2013), 94-101, doi: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12187>
49. V. Ribas, C. Garcia – Ruiz, J.C. Fernandez – Checa, Glutathione and mitochondria, *Frontiers in Pharmacology*, 5 (2014), 151, doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00151>
50. H. Sepasi Tehrani, A. Moosavi – Movahedi, Catalase and its mysteries, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2018, 1-8, doi: <http://doi.org/10.1016/j.obiomolbio.2018.03.001>
51. K. Das, A. Roychoudhury , Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Frontiers in Environmental Science*, 2014, doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
52. M. Hacker, K. Bachmann, W. Messer, *Pharmacology: Principles and practise*, 2009, 166-167

53. R. Raoufinia, A. Mota, N. Keyhanvar, F. Safari, S. Shamekhi, J. Abdolalizadeh, Overview of Albumin and Its Purification Methods, *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6 (2006), 495–507. doi: <https://doi.org/10.15171/apb.2016.063>
54. URL: <https://www.synlab.hr/pretraga/transferin-serum/> (5.7.2020.)
55. P. Surai, I. Kochish, V. Fisinin, M. Kidd, Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update, *Antioxidants*, 8 (2019), 235, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox8070235>
56. B.J. Day, Catalase and glutathione peroxidase mimics, *Biochemical Pharmacology*, 77 (2009), 285-296, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.09.029>
57. URL: [https://www.ucg.ac.me/skladiste/blog\\_20436/objava\\_18076/fajlovi/ENZIMI%20STOMAT%202018.pdf](https://www.ucg.ac.me/skladiste/blog_20436/objava_18076/fajlovi/ENZIMI%20STOMAT%202018.pdf) (5.7.2020.)
58. B. Mildner, *Osnove biokemije*, PMF (prezentacija), 2014
59. S. Martines Cuesta, S. Rahman, N. Furnham, J. Thornton, The Classification and Evolution of Enzyme Function, *Biophysical Journal*, London, 109 (2015), 1-5, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>
60. J.M. Berg, J.L. Tynoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Sixth Edition, New York, 2007
61. W.A. Loughlin, *Biotransformations in organic synthesis*, *Bioresource Technology*, Australija, 74 (2000), 49-62, doi: [http://doi.org/10.1016/s0960-8524\(99\)00145-5](http://doi.org/10.1016/s0960-8524(99)00145-5)
62. R.M. Daniel, M.J. Danson, Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding, *FESB Letters*, New Zealand and UK, 587 (2013), 2738-2743, doi: <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.06.027>
63. URL: <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/enzimi-hrani> (10.8.2020.)
64. T. Iwase, A. Tajima, S. Sugimoto, K. Okuda, I. Hinonaka, Y. Kamata, K. Takada, Y. Mizunoe, A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A visual approach, *Scientific Reports*, 3 (2013), 3081, doi: <http://doi.org/10.1038/srep03081>
65. A. Nandi, L. Yan, C. Jana, N. Das, Role of Catalase in Oxidative Stress – And Age – Associated Degenerative Diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1-19, doi: <http://doi.org/10.1155/2019/9613090>

- 66 J. Peran, Značenje katalaze u procesima oplemenjivanja tekstila, *Tekstil, Hrvatska*, 65 (2016), 410-416
67. H. Kirkman, G. Gaetani, Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, USA*, 81 (1984), 4343-4347, doi: <http://doi.org/10.1073/pnas.81.14.4343>
68. URL: <https://biology441.wordpress.com/2016/10/01/catalase-breaking-the-bad/> (22.8.2020.)
69. P. Nicholls, I. Fita, P. Loewen, Enzymology and structure of catalases, *Advances in Inorganic Chemistry, UK*, 51 (2000), 51-106
70. H. Aebi, Catalase in vitro, *Oxygen Radicals in Biological Systems*, 13 (1984), 121-126, doi: <https://doi.org/10.1016/s0076->
71. M. Alfonso-Prieto, X. Biarnes, P. Vidossid, C. Rovira, The Molecular Mechanism of the Catalase Reaction, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009), 11751-11761
72. S. Islamović, B. Galić, M. Miloš, A study of the inhibition of catalase by dipotassium trioxohydroxytetrafluorotriborate  $K_2[B_3O_3F_4OH]$ , *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 29(2014), 744-748, doi: <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.848203>
73. M. Goyal, A. Basak, Human catalase: Looking for complete identity, *Protein and cell*, 1 (2010), 888-897, doi: <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0113-z>
74. K. Topcu, D. Kirici, M. Evcil, Catalase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in young people, *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 19 (2006), 600-602, doi: <https://doi.org/10.4103/1119-3077.188698>
75. M. Eason, X. Fan, The role and regulation of catalase in respiratory tract opportunistic bacterial pathogens, *Microbial Pathogenesis*, 74 (2014), 50-58, doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.07.002>

76. Određivanje aktivnosti katalaze spektrofotometrijskom metodom, Bioanalitička kemija, laboratorijske vježbe
77. J. Likić, Tajna mudrih glava, 2009, biologija.com.hr
78. H. Mitsuda, K. Yasumatsu, Studies on Plant Catalase, Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, doi: <https://doi.org/10.1080/03758397.1955.10857290>
79. M. Esaka, T. Asahi, Purification and Properties of Catalase from Sweet Potato Root Microbodies, Plant and Cell Physiology, 23 (1982), 315-322, doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076352>
80. R.J. Weston, The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review, Food Chemistry, 71 (2000), 235-239
81. Cayman Chemical Company, Catalase Assay Kit, Sigma Aldrich, 2005, 1-8
82. Lodish, Berk, Matsudaria, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell, Molecular Cell Biology, 5<sup>th</sup> Edition
83. Luis A. del Río, ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. Plant and Cell Physiology, 2016
84. Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Molecular Biology of the Cell, 5<sup>th</sup> Edition
85. S. Shin, H. Cho, S. Song, Catalase and nonalcoholic fatty liver disease, Pflugers Archiv European Journal of Physiology, 2018, doi: <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2195-z>
86. M. Bayindir E. Bayindir, Synergic Viral-Bacterial Co-Infection in Catalase-Deficient COVID-19 Patients Causes Suppressed Innate Immunity and Lung Damages Due to Detrimental Elevation of Hydrogen Peroxide Concentration, SSRN Electronic Journal, 2020
87. <https://images.app.goo.gl/UANswkethGhyAx9A7> (15.9.2020.)