

Received: 2011.06.17
Accepted: 2011.09.26
Published: 2011.10.06

Enzymosomy antyoksydacyjne – właściwości i zastosowanie

Antioxidant enzymesomes – properties and application

Magdalena Skólmowska, Marek Kmiec

Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Streszczenie

Zastosowanie wyizolowanej katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej w praktyce napotyka na wiele trudności związanych przede wszystkim z utratą ich aktywności, a nawet całkowitą degradacją. Oba enzymy, katalaza i dysmutaza ponadtlenkowa właściwie nie przenikają przez błony biologiczne, co ogranicza lub wręcz uniemożliwia ich działanie ochronne skierowane przeciwko reaktywnym formom tlenu. Jednakże przejście przez barierę błonową staje się możliwe po umieszczeniu enzymów w strukturach lipidowych. Jedną z technologii stabilizacji aktywności enzymów polega na zamykaniu ich wewnątrz struktury lipidowej. Zamknięcie enzymów wewnątrz struktury liposomów, czy też pomiędzy ich dwuwarstwę lipidową, zapobiega m.in. niepożądanym reakcjom i jednocześnie chroni je przed degradacją, której uległyby podczas stosowania w postaci nieosłoniętej. Jednocześnie powoduje wydłużenie ich okresu półtrwania, wzrost ich aktywności oraz stabilności. Strukturę, w której enzym zamknięty jest wewnątrz liposomu nazywamy enzymosomem.

Słowa kluczowe:

enzymy antyoksydacyjne • dysmutaza ponadtlenkowa • katalaza • liposomy • enzymosomy

Summary

The application of catalase and superoxide dismutase in daily practice encounters many difficulties connected first of all with their loss of activity, and even with their degradation. Both enzymes, catalase and superoxide dismutase, practically do not penetrate biological membranes, which limits or even makes impossible their protective activity directed against ROS. However, the penetration of the membranous barrier becomes possible after the location of the enzymes in lipidic structures. One of the technologies of stabilization of the activity of enzymes consists in closing them in a liposome structure. The incorporation of the enzymes into a closed, such as liposome, structure or into their lipid bilayer screens and simultaneously protects them against degradation which they would undergo during use in the unshaded form. Concurrently it extends their half life and also increases their activity and stability. The structure in which an enzyme is enclosed in a liposome is called an enzymesome.

Key words:

antioxidant enzymes • superoxide dismutase • catalase • liposomes • enzymesomes



Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=962163>**Word count:** 1955**Tables:** –**Figures:** 2**References:** 27**Adres autora:** prof. dr hab. inż. Marek Kmieć, Katedra Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, ul. Doktora Judyma 6, 71-466 Szczecin; e-mail: marek.kmiec@zut.edu.pl**Wykaz skrótów:** **CAT** – katalaza (catalase); **GSH-Px** – peroksydaza glutationowa (glutathione peroxidase); **PEG-DSPE** – distearylofosfatydyletanolamine-poli(etylenoglikol) 2000 (distearylphosphatidylethanolamine-poly(ethyleneglycol) 2000); **RFT** – reaktywne formy tlenu (reactive oxygen species); **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa (superoxide dismutase); **WRT** – wolne rodniki tlenowe (free oxygen radicals).

WPROWADZENIE

Kontakt żywego organizmu z tlenem cząsteczkowym oprócz korzyści związanych z uzyskiwaniem energii życiowej wiąże się z powstawaniem reaktywnych form tego pierwiastka (RFT), z których większość stanowią cząsteczki o charakterze wolnych rodników. Ocenia się, że 2–5% tlenu pochłoniętego przez organizm ulega konwersji do RFT [7]. Wolne rodniki tlenowe (WRT) to struktury bardzo reaktywne, działające szybko i nieswoiście. Szczególną wrażliwość na ich działanie wykazują lipidowe błony biologiczne, zarówno zewnętrzne, jak i wewnętrzne, stanowiące podstawę struktury i funkcji komórki. Wiąże się to z dużą zawartością w błonach, podatnych na utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych. Duże stężenie RFT sprzyja również utlenianiu białek oraz kwasów nukleinowych, pozabawiając je tym samym ich funkcji biologicznej. Ustalono, że w przypadku organizmów wyższych, ekspozycja na reaktywne formy tlenu prowadzi do przyspieszenia procesów starzenia i rozwoju wielu chorób, m.in. układu krążenia, stawów czy autoagresji, a w przypadku struktur jednokomórkowych do ich degradacji [22,26].

OBRONA ANTYOKSYDACYJNA

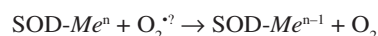
Aby przeciwdziałać samoutlenianiu organizmy wykształciły złożony system obrony antyoksydacyjnej, oparty na współdziałaniu wielu wyspecjalizowanych zespołów cząsteczek o zróżnicowanej mocy redukcyjnej, tzw. zmiataczy wolnych rodników. Oprócz lepiej poznanych przeciwutleniaczy niskocząsteczkowych, takich jak: kwas askorbinowy (witamina C), tokoferol (witamina E) lub beta-karoten (witamina A) układ antyoksydacyjny współtworzą wyspecjalizowane katalizatory białkowe – enzymy antyoksydacyjne i naprawcze. Do najważniejszych z nich należą: katalazy (CAT – catalase, EC 1.11.1.6) i peroksydazy glutationowe (GPx – glutathione peroxidase, EC 1.11.1.9) rozkładające nadtlenuk wodoru oraz dysmutazy ponadtlenkowe (SOD – superoxide dismutase, EC 1.15.1.1) biorące udział w unieszkodliwieniu anionorodnika ponadtlenkowego. Enzymy te tworzą zintegrowany, bardzo czuły i swoisty system antyoksydacyjny określany mianem triady antyoksydacyjnej [9].

Zarówno dysmutazy ponadtlenkowe, jak i katalazy należą do klasy oksydoreduktaz. Dysmutaza ponadtlenkowa

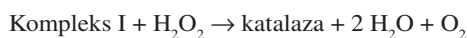
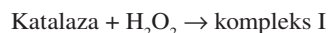
(oksydoreduktaza $O_2^{\cdot-}$: $O_2^{\cdot-}$) jest oligomerem o masie molekularnej 32–132 kDa [27]. Istotą działania tego enzymu jest katalizowanie reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenuku wodoru i wody [24]. Funkcja dysmutazowa SOD jest związana z redukcją i utlenianiem jonów metali stanowiących grupę prostetyczną enzymu. Wyróżnia się trzy podstawowe izoformy enzymu:

- Zn,Cu-SOD (zawierająca miedź i cynk, występująca w cytoplazmie i chloroplastach),
- Mn-SOD (zawierająca mangan, występująca w mitochondriach),
- EC-SOD (zawierająca miedź i cynk, wydzielana na zewnątrz komórki).

Reakcja przebiega dwuetapowo. Pierwszy etap to redukcja jonu metalu z jednoczesnym uwolnieniem cząsteczki tlenu. Drugi etap to utlenienie jonu metalu z udziałem anionorodnika ponadtlenkowego i wodoru z jednoczesnym wytworzeniem nadtlenuku wodoru [4].



Katalaza (oksydoreduktaza H_2O_2 : H_2O_2) jest enzymem oligomerycznym, występującym najczęściej jako homotetramer o masie molowej 200–340 kDa i jest jednym z najbardziej aktywnych enzymów w organizmie. W zależności od stężenia H_2O_2 w środowisku, enzym może wykazywać aktywność katalazową lub peroksydazową. Przy wysokich stężeniach H_2O_2 przeważa aktywność katalazowa. Po przyłączeniu cząsteczki nadtlenuku wodoru do centrum katalitycznego, katalaza tworzy kompleks (I) zdolny do podjęcia funkcji enzymatycznej. Przy funkcji katalazowej kompleks ten reaguje z następną cząsteczką H_2O_2 , przekształcając ją w wodę i tlen [19].



LIPOSOMY

W praktyce zastosowanie katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej napotyka na wiele trudności związanych przede wszystkim z utratą ich aktywności, a nawet ich degradacją.



Ryc. 1. Trzy linie obrony układu antyoksydacyjnego

Ponadto duże hydrofilne cząsteczki białek, do których należą zarówno katalaza, jak i dysmutaza ponadtlenkowa właściwie nie przenikają przez błony biologiczne, co ogranicza lub wręcz uniemożliwia ich działanie ochronne skierowane przeciwko RFT, które powstają w wyniku przemian wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Przekroczenie bariery błonowej staje się jednak możliwe po umieszczeniu enzymów w strukturach (matrycach) lipidowych. Jedną z technik stabilizacji aktywności enzymów jest zamykanie ich w strukturze liposomów [18]. Z pracy Beckmana i Minora [2] wynika, że liposomy zawierające SOD i CAT inkubowane z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych mogą pokonać barierę błonową komórek. W opisanym doświadczeniu dwugodzinna inkubacja doprowadziła do 44-krotnego wzrostu aktywności enzymatycznej SOD w komórce.

Liposomy są cząstkami uzyskiwanymi podczas hydratacji fosfolipidów o budowie sferycznej. Możliwości ich powstawania wynikają z wyjątkowo korzystnego kształtu cząsteczek i wysokiej wartości indeksu powinowactwa do środowiska hydrofobowego i hydrofilnego (HLB – hydrophilic-lipophilic balance), oraz minimalizacji całkowitej energii brzegowej następującej w czasie zaginania płaskiej dwuwarstwy i tworzenia zamkniętych struktur dzięki czemu większość fosfolipidów tworzy agregaty dwuwarstwowe.

Liposomy dzielimy na trzy główne klasy:

1. Wielowarstwowe pęcherzyki lipidowe (MLV) wielkości 200 nm – kilka mikronów.
2. Małe jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (SUV) wielkości 25–100 nm.
3. Duże jednowarstwowe pęcherzyki lipidowe (LUV) wielkości 100–400 nm.

Rozwój badań nad liposomami umożliwił praktyczne wykorzystanie zdolności zamykania solutów (np. enzymów) w strukturach utworzonych z naturalnych składników błon biologicznych, a więc obojętnych immunologicznie. Technologia liposomowa umożliwia wprowadzenie solutów do środowisk hydrofobowych, a nawet do wnętrza komórek w sposób ukierunkowany i kontrolowany. Wprowadzenie enzymów umieszczonego w strukturach zamkniętych typu liposom lub wbudowanych w ich dwuwarstwę lipidową zapobiega m.in. niepożądanym reakcjom i jednocześnie chroni je przed degradacją, której uległyby podczas stosowania w postaci nieosłoniętej. Daje to szerokie możliwości zastosowania ich jako:

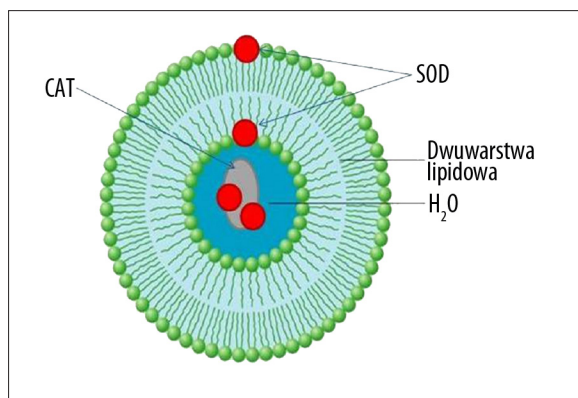
- nośniki substancji bioaktywnych/leków,
- nośniki enzymów m.in. antyoksydacyjnych (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza),
- niewirusowe nośniki kwasów nukleinowych w terapiach genowych,
- modele błon biologicznych.

Liposomy wykorzystywane, jako nośnik substancji czynnych, muszą się charakteryzować określonymi parametrami, do których zalicza się wielkość pęcherzyków lipidowych. Jako nośnika enzymów antyoksydacyjnych aplikowanych dożylnie lub podskórnie proponuje się wykorzystanie małych liposomów o średnicy około 110 nm (LUV) skoniugowanych z glikolem polietylenowym. Taka wielkość liposomu sprzyja jego korzystniejszej biodystrybucji, co oznacza mniejszy stopień akumulacji w wątrobie i śledzionie, a także wydłuża czas cyrkulacji preparatu w układzie krążenia w porównaniu do liposomów o średnicy 200 nm [4,5]. Drugim parametrem również istotnym jest rodzaj lipidów, które budują dwuwarstwę lipidową. Liposomy charakteryzuje ładunek ujemny lub dodatni w zależności od ich elementów budulcowych. Liposomy o ładunku ujemnym znalazły zastosowanie w substancjach czynnych o działaniu zewnątrzkomórkowym [13]. Liposomy charakteryzujące się dodatnim ładunkiem są wykorzystywane w przypadku konieczności dostarczania molekuł do wnętrza komórki [12,17]. Dodatkowo liposomy mogą się charakteryzować zawartością cholesterolu, który „uszywnia” dwuwarstwę lipidową.

ENZYMOSOMY

Enzymy antyoksydacyjne należą do makromolekuł, dlatego też nie są zdolne do swobodnego przejścia przez błony komórkowe. Jedną z możliwości ułatwienia transportu wewnątrzkomórkowego jest zamknięcie ich w liposomy. Badania Briscoe'a i wsp. [3] wykazały, że skonstruowanie odpowiednich liposomów i zamknięcie w nich dysmutazy ponadtlenkowej spowodowało 6-krotny wzrost wydajności transportu tego enzymu do wnętrza komórek. Inkubowanie liposomów zawierających zamkniętą w nich dysmutazę ponadtlenkową z kulturą komórek nabłonka płuc płodów szczurzych potwierdziło wzrost aktywności (5-krotny) tego enzymu z 7,8 do 40,1 U SOD/mg białka komórek.

Ważnym argumentem przemawiającym za wykorzystaniem liposomów jako nośników enzymów antyoksydacyjnych są doniesienia potwierdzające, że okres półtrwania zarówno katalazy jak i dysmutazy ponadtlenkowej zamkniętej w pęcherzyku lipidowym ulega zdecydowanemu wydłużeniu. Badania Turrensa [23] i Corvo [6] wykazały, że podanie do krwiobiegu szczurów katalazy zamkniętej w liposomie wydłużyła jej okres półtrwania z 20 minut do 2,4 godziny (7-krotnie), natomiast w przypadku dysmutazy z 8 minut do 4,2 godziny (ponad 30-krotnie). Doniesienie to potwierdziły inne badania, z których wynika, że immobilizacja SOD w strukturze liposomu sprzyja zachowaniu aktywności enzymu. Wpływ dysmutazy ponadtlenkowej, o której wiadomo, że katalizuje reakcję dysproporcjonowania $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 , na stres oksydacyjny badano w obecności sztucznych błon lipidowych liposomów w celu uzyskania podstawowych informacji o systemie zmiatania RFT. SOD traci aktywność w obecności H_2O_2 i jak wykazano ma dwie pętle, których jedna zawiera α -helisę umożliwiającą interakcję substratu ($O_2^{\cdot-}$) z centrum aktywnym zawierającym Cu(II).



Ryc. 2. Enzymosom. Schemat ulokowania się enzymu w strukturze liposomu: wewnątrz bądź w dwuwarstwie lipidowej

Szczegółowe badania struktury kompleksu enzymu z nadtlenkiem wodoru wykazały obniżenie aktywności enzymu i ujawniły związek konformacji pętli zawierającej α -helisę z aktywnością enzymu. Dysmutaza ponadtlenkowa zamknięta w liposomy zbudowane z 1-palmitoilo-2-oleilo-sn-glicerolo-3-fosfocholiny (POPC), wykazywała oporność na inaktywację przez H_2O_2 , mimo że zawartość struktury α -helisy ulegała obniżeniu. Wykazano również, że w czasie stresu oksydacyjnego utleniona SOD wchodzi w interakcję z powierzchnią liposomu [15].

Również immobilizacja katalazy w liposomach prowadzi do wzrostu jej stabilności. Enzym zamknięty w strukturze liposomu, w porównaniu z enzymem wolnym, skuteczniej rozkładał nadtlenek wodoru, co autorzy doniesienia wiążą z ochronnym działaniem błony lipidowej ograniczającej masowy kontakt enzymu z substratem i obniżeniem stopnia inhibicji enzymu wywołanej nadmiarem H_2O_2 . Przechowywanie katalazy w temp. $4^\circ C$, zamkniętej w strukturze liposomu zapewnia jej większą stabilność w porównaniu do postaci wolnej tego enzymu [25].

Bardziej zaawansowaną strategią w technologii liposomowej jest wbudowywanie enzymów w dwuwarstwę lipidową. Wymaga to jednak ich wcześniejszej modyfikacji polegającej na nadaniu białku właściwości hydrofobowych [11]. Dysmutazę ponadtlenkową poddaje się chemicznej modyfikacji poprzez kowalencyjne łączenie łańcuchów kwasów tłuszczowych z dostępnymi grupami ϵ -aminowymi tego enzymu. Ta metoda acylowania prowadzi do powstania nowej jednostki (AC-SOD) z innymi właściwościami fizykochemicznymi w porównaniu do SOD. System, w którym enzym wbudowany jest w dwuwarstwę lipidową nosi nazwę enzymosomu [11]. Skuteczność enzymosomu, którego głównym składnikiem była dysmutaza ponadtlenkowa potwierdzono w badaniach nad reumatoidalnym zapaleniem stawów, prowadzonych *in vivo* na szczurach. Badania te wykazały, że zmodyfikowana dysmutaza ponadtlenkowa jest zdolna do inkorporacji w strukturę lipidową liposomu, gdzie przeważnie występuje na zewnętrznej powierzchni cząstki liposomu, co oznacza, że jej aktywność jest skierowana do środowiska zewnętrznego. Zmodyfikowany i wbudowany w strukturę liposomu enzym charakteryzował się większą efektywnością w zmniejszeniu obrzęku stawów po podaniu preparatu [10].

Niesman i wsp. [16] przeprowadzili doświadczenie z nowo narodzonymi szczurami, u których zdiagnozowano wczesną

retinopatię. Spróbowano spowodować wzrost aktywności siatkówkowej dysmutazy ponadtlenkowej poprzez wewnątrztrzewnowe podawanie egzogennej dysmutazy ponadtlenkowej zamkniętej w liposomach. Jednej grupie podawano dwa razy dziennie liposomy zawierające egzogenne SOD, natomiast drugiej grupie podawano liposomy z solą fizjologiczną. Dodatkowo w każdej z grup, część szczurów była trzymana w atmosferze zawierającej 80% tlenu, a część była trzymana w atmosferze pokojowej, zawierającej 21% tlenu. Zwierzęta trzymane w atmosferze zawierającej 80% tlenu miały znacząco obniżony poziom aktywności siatkówkowej SOD w 6 dniu życia w porównaniu do zwierząt trzymany w atmosferze pokojowej. W 6 dniu, po codziennej suplementacji, aktywność siatkówkowej SOD znacząco wzrosła, a także została zredukowana zawartość wzbudzonego tlenu. Podawanie egzogennej SOD nie wykazało szkodliwego działania w żadnej z grup. Doświadczenie to wykazało korzystne działanie podawanej egzogennej dysmutazy ponadtlenkowej zamkniętej w liposomach na komórki siatkówki oka i dzięki temu stało się potencjalną strategią w terapii wczesnej retinopatii.

Doświadczenia prowadzone na hodowlach komórek śródbłonna aorty i szczurach, poddanych działaniu 95–100% tlenu wykazały, że dodanie enzymosomów zawierających SOD powodowało 15-krotny wzrost swoistej aktywności komórkowej SOD. Natomiast podawanie szczurom doustrowo mieszaniny enzymosomów zawierających SOD i CAT spowodowało 4-krotny wzrost aktywności enzymów płucnych, a także wydłużenie ich okresu półtrwania. W istotny sposób zapobiegały toksycznemu wpływowi tlenu w warunkach *in vivo* [8]. Baker [1] wykazał, że podanie enzymosomów zawierających SOD i CAT poprzez inhalację, powoduje wzrost aktywności tych enzymów w pęcherzykach płucnych typu II, przy czym wzrost aktywności SOD obserwujemy po 4 godzinach od podania, a powrót do poziomu kontrolnego po 24 godzinach. Natomiast w przypadku katalazy po upływie 24 godzin jej aktywność wciąż pozostaje znacząco podwyższona.

Enzymosomy zawierające katalazę (160U) znalazły zastosowanie w zapobieganiu powstawaniu, wynikających z toksycznego wpływu tlenu, chronicznych zmian w płucach młodych szczurów. Chronią one zarówno naczynia jak i miąższ płuc [21].

Badania Tanswella i wsp. [20] wykazały, że podawanie doustrowo enzymów antyoksydacyjnych zamkniętych w liposomach nowo narodzonym szczurom, zwiększa ich przeżywalność z 40 do 71% w atmosferze 95% O_2 .

Badania prowadzone nad możliwością wykorzystania enzymosomów zawierających SOD w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów wykazały, że skład i wielkość liposomów mają decydujący wpływ na okres półtrwania enzymosomów w krwiobiegu i ich efektywność. Lepsze okazały się małe liposomy (110 nm) w porównaniu z dużymi (450 nm) [4], zbudowane z PEG-DSPE zmniejszają 8-krotnie wyciek substancji zamkniętej wewnątrz liposomu [5]. Małe liposomy mają 17-krotnie większą zdolność absorpcji w miejscu stanu zapalnego, a SOD w nich zamknięta wykazuje większą aktywność w porównaniu z dużymi liposomami [4].

Enzymosomy znalazły zastosowanie również w radioterapii, ponieważ badania Lamproglou wykazały, że podawanie SOD zamkniętych w liposomach zmniejsza negatywne skutki terapii, związane z powstawaniem wyniszczającego „stresu oksydacyjnego” [14].

Dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza, zamknięte w struktury liposomowe, dają duże możliwości wykorzystania w terapii chorób, których następstwem jest pojawienie się wolnych rodników. Podawanie takich enzymosomów

pobudza własny system antyoksydacyjny do wytwarzania antyoksydantów, uzupełnia również ich braki poprzez dostarczenie ich z zewnątrz. Dzięki wciąż doskonalszym technikom liposomowym możemy w sposób bardzo wydajny dostarczać enzymy do organizmu, ponieważ dwuwarstwa lipidowa chroni ich aktywność i zapewnia większą stabilność w porównaniu do wolnej postaci enzymu, a tym samym już niewielka ilość enzymu pozwala osiągnąć zamierzony efekt.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Baker R.R., Czop L., Jilling T., Freeman B.A., Kirk K.L., Matalon S.: Quantitation of alveolar distribution of liposome-entrapped antioxidant enzymes. *Am. J. Physiol.*, 1992; 263: L585–L594
- [2] Beckman J.S., Minor R.L., White C.W., Repine J.E., Rosen G.M., Freeman B.: Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem.*, 1988; 263: 6884–6892
- [3] Briscoe P., Caniggia I., Graves A., Benson B., Huang L., Tanswell A.K., Freeman B.A.: Delivery of superoxide dismutase to pulmonary epithelium via pH-sensitive liposomes. *Am. J. Physiol.*, 1995; 268: L374–L380
- [4] Corvo M.L., Boerman O.C., Oyen W.J., Jorge J.C., Cruz M.E., Crommelin D.J., Storm G.: Subcutaneous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes: *in vivo* fate and therapeutic activity in an inflammation model. *Pharm. Res.*, 2000; 17: 600–606
- [5] Corvo M.L., Boerman O.C., Oyen W.J., Van Bloois L., Cruz M.E., Crommelin D.J., Storm G.: Intravenous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes. II. *In vivo* fate in a rat model of adjuvant arthritis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1999; 1419: 325–334
- [6] Corvo M.L., Martins M.B., Francisco A.P., Morais J.G., Cruz M.E.: Liposomal formulations of Cu,Zn-superoxide dismutase: physicochemical characterization and activity assessment in an inflammation model. *J. Controlled Release*, 1997; 43: 1–8
- [7] Farbiszewski R., Skrzydlewska E.: Mechanizmy adaptacyjne komórki i usuwanie uszkodzeń wywołanych stresem oksydacyjnym. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 1996; 50: 613–620
- [8] Freeman B.A., Turrens J.F., Mirza Z., Crapo J.D., Young S.L.: Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase. *Fed. Proc.*, 1985; 44: 2591–2595
- [9] Gałęcka E., Jacewicz R., Mrowicka M., Florkowski A., Gałęcki P.: Enzymy antyoksydacyjne – Budowa, właściwości, funkcje. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; 25: 266–268
- [10] Gaspar M.M., Boerman O.C., Laverman P., Corvo M.L., Storm G., Cruz M.E.: Enzymosomes with surface-exposed superoxide dismutase: *in vivo* behavior and therapeutic activity in a model of adjuvant arthritis. *J. Controll. Release*, 2007; 117: 186–195
- [11] Gaspar M.M., Martins M.B., Corvo M.L., Cruz M.E.: Design and characterization of enzymosomes with surface-exposed superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003; 1609: 211–217
- [12] Imaizumi S., Woolworth V., Fishman R.A., Chan P.H.: Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces cerebral infarction in cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1990; 21: 1312–1317
- [13] Jubeň T.T., Nadler-Milbauer M., Barenholz Y., Rubinstein A.: Local treatment of experimental colitis in the rat by negatively charged liposomes of catalase, TMN and SOD. *J. Drug Target*, 2006; 14: 155–163
- [14] Lamproglou I., Magdelenat H., Boisserie G., Baillet F., Mayo W., Fessi H., Puisieux F., Perderau B., Colas-Linhart N., Delattre J.Y.: An experimental model of acute encephalopathy after total body irradiation in the rat: effect of liposome-entrapped Cu/Zn superoxide dismutase. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1998; 42: 179–184
- [15] Nagami H., Yoshimoto N., Umakoshi H., Shimanouchi T., Kuboi R.: Liposome-assisted activity of superoxide dismutase under oxidative stress. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005; 99: 423–428
- [16] Niesman M.R., Johnson K.A., Penn J.S.: Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. *Neurochem. Res.*, 1997; 22: 597–605
- [17] Stanimirovic D.B., Markovic M., Micic D.V., Spatz M., Mrsulja B.B.: Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces ischemia/reperfusion 'oxidative stress' in gerbil brain. *Neurochem. Res.*, 1994; 19: 1473–1478
- [18] Stone W.L., Smith M.: Therapeutic uses of antioxidant liposomes. *Mol. Biotechnol.*, 2004; 27: 217–230
- [19] Ścibor D., Czeczot H.: Katalaza – budowa, właściwości, funkcje. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2006; 60: 170–180
- [20] Tanswell A.K., Freeman B.A.: Liposome-entrapped antioxidant enzymes prevent lethal O₂ toxicity in the newborn rat. *J. Appl. Physiol.*, 1987; 63: 347–352
- [21] Thibeault D.W., Rezaiekhaligh M., Mabry S., Beringer T.: Prevention of chronic pulmonary oxygen toxicity in young rats with liposome-encapsulated catalase administered intratracheally. *Pediatr Pulmonol.*, 1991; 11: 318–327
- [22] Thomas M.J.: The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 2000; 16: 716–718
- [23] Turrens J.F., Crapo J.D., Freeman B.A.: Protection against oxygen toxicity by intravenous injection of liposome-entrapped catalase and superoxide dismutase. *J. Clin. Invest.*, 1984; 73: 87–95
- [24] Wójcicka G., Bełtowski J.: Stres oksydacyjny w zapaleniu kłębuszków nerkowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2001; 55: 855–869
- [25] Yoshimoto M., Sakamoto H., Yoshimoto N., Kuboi R., Nakao K.: Stabilization of quaternary structure and activity of bovine liver catalase through encapsulation in liposomes. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 2007; 41: 849–858
- [26] Zabłocka A., Janusz M.: Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 118–124
- [27] Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J.: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu,Zn-SOD (sod1), Mn-SOD (sod2), and EC-SOD (sod3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 337–349

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

