

УДК 577.114.4:577.151.03

UDC 577.114.4:577.151.03

**ИММОБИЛИЗАЦИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ
ХРЕНА В ГИДРОГЕЛЕ И МИКРОЧАСТИЦАХ
АЛЬГИНАТА КАЛЬЦИЯ****HORSERADISH PEROXIDASE
IMMOBILIZATION IN CALCIUM ALGINATE
HYDROGEL AND MICROPARTICLES**

Пестовский Юрий Сергеевич
к.х.н.
ООО “Эколит”, г. Москва

Pestovsky Yuri Sergeyevich
Cand.Chem.Sci.
“Ekolit” Company, Moscow

В статье проведено сравнение устойчивости двух полученных различными способами препаратов иммобилизованной пероксидазы хрена, а также свободного фермента. Показано, что оба препарата иммобилизованной пероксидазы обладают повышенной стабильностью при хранении и нагревании. Установлено, что активность полученного гидрогеля после прогрева возрастает

In the article two differently obtained preparations of immobilized horseradish peroxidase are compared with free enzyme and with each other by their stability. It is shown that both preparations of immobilized peroxidase possess increased stability during storage and heating. It is established that activity of hydrogel obtained increases after heating

Ключевые слова: ПЕРОКСИДАЗА ХРЕНА,
АЛЬГИНАТ КАЛЬЦИЯ, ИММОБИЛИЗАЦИЯ,
КИНЕТИКА ИНАКТИВАЦИИ

Keywords: HORSERADISH PEROXIDASE,
CALCIUM ALGINATE, IMMOBILIZATION,
INACTIVATION KINETICS

Ключевым требованием к терапевтическому использованию лекарственных препаратов является возможность пространственного и временного контроля их высвобождения. Один из перспективных способов достижения этой цели – создание биodeградируемых полимерных микрочастиц с инкапсулированными биологически активными молекулами.

Преимуществами инкапсулирования фермента в полисахаридном геле при разработке новых лекарственных форм являются отсутствие необходимости в дополнительной функционализации носителя [1, 2], стабилизация против инактивации при хранении [1] и при воздействии внешних факторов [3], снижение иммуногенности препарата [4], возможное повышение начальной активности за счет эффектов микроокружения [2], а также постепенное высвобождение фермента [1], что обеспечивает пролонгированное действие препарата. Возможность контролируемого высвобождения ферментов [5] позволяет существенно расширить области их терапевтического применения.

В настоящей работе изучено влияние иммобилизации пероксидазы хрена с использованием кальций-альгинатного носителя на функциональные свойства ферментного препарата. Кальций-альгинатный гель широко применяется в фармацевтике и биомедицине, так как он образуется в мягких условиях при комнатной температуре, биodeградируем в физиологических условиях и близок по гидродинамическим характеристикам к природным тканям [1].

Пероксидаза хрена широко применяется в биохимических исследованиях как модельный фермент [1, 6, 7, 8], так как ее свойства подробно изучены и разработаны высокочувствительные, надежные и не сопряженные с техническими сложностями методы измерения активности данного фермента [9]. С точки зрения практического применения, пероксидазы различных видов имеют перспективы использования в терапевтических целях [10-20]. Таким образом, иммобилизация пероксидазы в обладающем биосовместимостью кальций-альгинатном геле представляется перспективной для создания новых ферментных лекарственных препаратов; полученные закономерности могут быть распространены и на препараты многих других ферментов.

Результаты исследований

Использование ферментных препаратов в качестве лекарственных средств накладывает значительные требования на их стабильность, включая термостабильность и стабильность при длительном хранении. Одним из эффективных методов стабилизации ферментов является инкапсулирование с использованием биосовместимой матрицы. В этой связи в настоящей работе исследовано влияние иммобилизации пероксидазы хрена на кальций-альгинатном носителе на стабильность фермента.

Иммобилизация пероксидазы хрена на кальций-альгинатном носителе. В настоящей работе были изучены два одинаковых по составу препарата пероксидазы хрена, иммобилизованной на кальций-альгинатном носителе, полученные методом внешнего гелеобразования. В одном случае раствор альгината вводится в раствор хлорида кальция при перемешивании. При этом гелеобразование происходит в области смешения растворов альгината натрия и хлорида кальция, что приводит к образованию однородного гидрогеля. В другом случае раствор альгината, содержащий фермент, вносится в раствор хлорида кальция в виде микрокапель, и гелеобразование происходит в направлении от поверхности к центру получаемых микрочастиц. Использование микроразбрызгивателя при этом позволяет получать однородные микрокапли заданного размера. Размер пор на поверхности микрочастиц, получаемых методом внешнего гелеобразования, меньше, чем при использовании метода внутреннего гелеобразования, что приводит к меньшим потерям фермента в процессе иммобилизации [21], большей прочности получаемых микрочастиц [22] и меньшей способности к сжатию [23]. Другая отличительная особенность получаемых методом внешнего гелеобразования микрочастиц – наличие плотной оболочки [23, 24], являющейся основным барьером при диффузии белков [23].

Полученные препараты характеризуются близкими значениями эффективного содержания фермента (7,4 мкг и 7,8 мкг на 1 мг гидратированных гидрогеля и микрочастиц соответственно), как было определено по калибровочной кривой, полученной для свободного фермента в интервале концентраций 0 – 0,002 мг/мл. Активности препаратов в реакции окисления ТМБ составляют 0,032 ед. и 0,046 ед. на 1 мг. Действительное содержание фермента составляет 1,1816 мкг на 1 мг сухого препарата. Отличие действительного содержания от эффективного

свидетельствует о том, что в процессе иммобилизации происходит активация фермента. Выход по ферменту составил 85%. Действительное содержание фермента и выход были получены, исходя из содержания пероксидазы в растворе до и после проведения иммобилизации, определявшегося по поглощению на 403 нм. Диаметр микрочастиц, определенный с помощью микроскопа, составляет порядка 0,5 мкм. На поверхности гидрогеля (рисунок 1) и микрочастиц (рисунок 2) имеются поры. Наружный диаметр некоторых из них составляет порядка нескольких нанометров.



Рисунок 1. Участок поверхности гидрогеля.

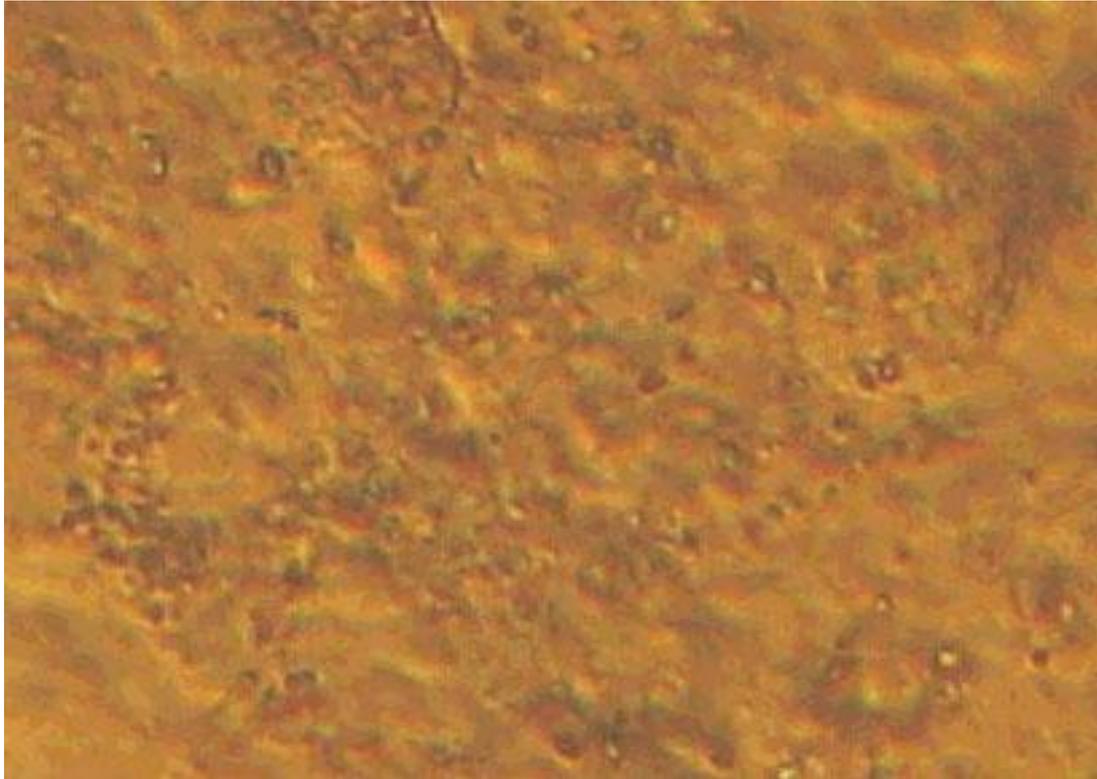


Рисунок 2. Участок поверхности микрочастиц.

Термостабильность полученных препаратов иммобилизованной пероксидазы и свободного фермента. На рисунке 3 представлены термоинактивационные кривые свободной и иммобилизованной в гидрогеле пероксидазы. Как видно из рисунка, в ходе инкубации при 60°C в течение 1 часа активность свободного фермента уменьшается в 10 раз (от 0,030 ед. до 0,003 ед.). Известно, что агрегации фермента в данных условиях не происходит [25].

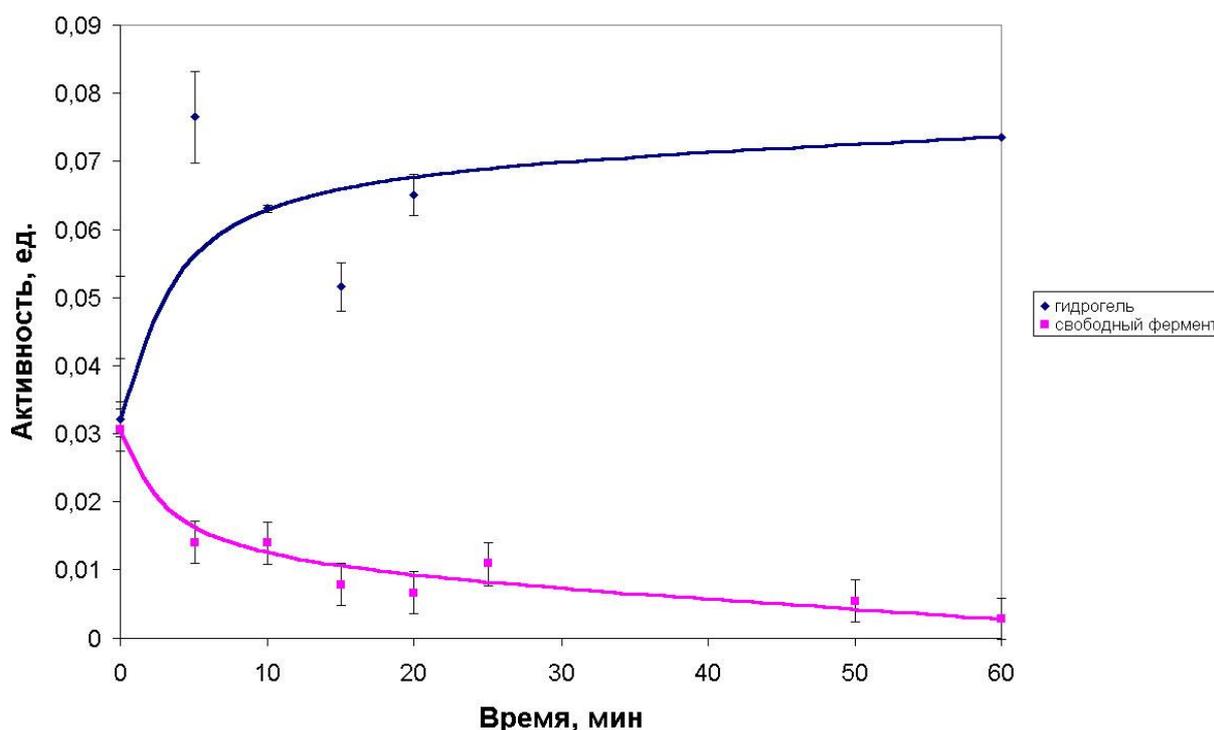


Рисунок 3. Зависимость активности пероксидазы хрена, иммобилизованной в гидрогеле, и активности свободного фермента в реакции окисления ТМБ пероксидом водорода от времени инкубации при рН 6,5 и 60°С.

В случае гидрогеля наблюдается необычный вид термоинактивационной кривой: активность иммобилизованного фермента в ходе инкубации при 60°С постепенно возрастает, стремясь к насыщению (см. рисунок 3). Так, активность препарата до начала инкубации составляет 0,032 ед., после 20 мин инкубации – 0,065 ед., после 60 мин инкубации – 0,073 ед. При этом начальные активности свободного и иммобилизованного фермента практически совпадают (см. рисунок 3). Таким образом, включение фермента в гидрогель приводит к увеличению активности ферментного препарата после инкубации в течение часа при 60°С в 25 раз по сравнению со свободным ферментом. Данный эффект не связан с высвобождением фермента в раствор, так как после отбора пробы иммобилизованного препарата раствор декантировали. Возрастание активности препарата может объясняться

увеличением количества доступного фермента в результате расширения пор гидрогеля при повышении температуры. Так, для случая агарозного геля было показано, что при повышении температуры размер его пор возрастает [26].

На рисунке 4 представлены данные по активности полученных препаратов пероксидазы до и после инкубации при 60°C в течение часа. Из приведенных данных следует, что начальная активность пероксидазы, иммобилизованной в микрочастицах, на 55% выше по сравнению со свободным ферментом (см. рисунок 4). После инкубации активность иммобилизованной пероксидазы практически не изменилась по сравнению с начальным уровнем. По-видимому, доступность фермента в микрочастицах изначально высока и не изменяется в ходе инкубации. При этом инактивации фермента также не происходит (см. рисунок 3). Таким образом, иммобилизация фермента в обоих рассмотренных случаях приводит к его стабилизации, поскольку после инкубации при 60°C в течение часа активность препаратов иммобилизованного фермента, в отличие от свободного фермента, не уменьшается по сравнению с начальной.

Возможной причиной стабилизации фермента при иммобилизации с использованием кальций-альгинатного носителя является закрепление каталитически активной конформации в результате многоточечных электростатических взаимодействий с полиэлектролитом. Известно, что при образовании фермент-полиэлектролитных комплексов ряда гидролитических ферментов (α -химотрипсина, субтилизина, целлюлазы и др.) данный эффект препятствует инактивации связанного фермента в присутствии денатурирующих добавок и при повышенных температурах [27-29]. Аналогичные результаты были получены и для пероксидазы в комплексе с гепарином [30]. Поскольку пероксидаза хрена

гликозилирована [31], возможна также реализация ее многоточечных взаимодействий с углеводным носителем за счет эффекта «заякоревания» [32].

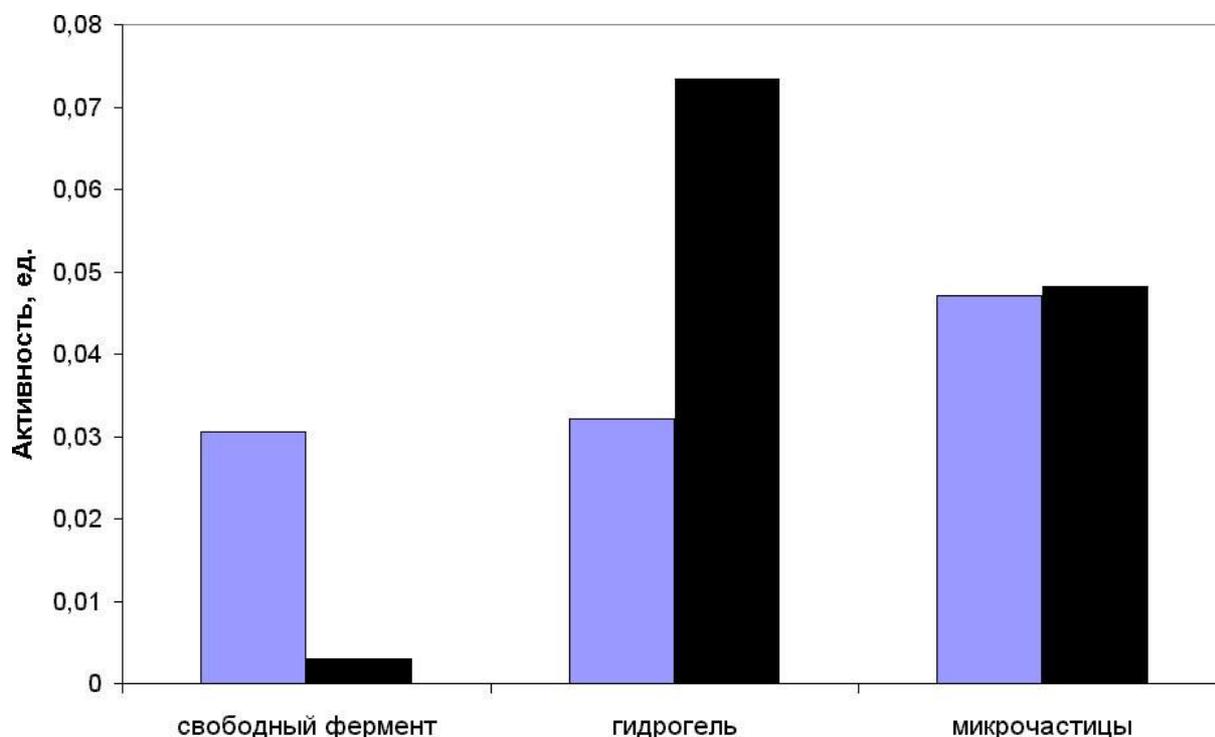


Рисунок 4. Сравнение активности препаратов свободной и иммобилизованной в гидрогеле и микрочастицах пероксидазы хрена, до (светлые столбцы) и после 60 мин инкубации при pH 6,5 и 60°C (темные столбцы).

Другим возможным механизмом стабилизации пероксидазы является предотвращение диссоциации гема. Так, в случае миоглобина было найдено, что диссоциация гема свободного белка при pH 4 происходит за несколько минут, однако после иммобилизации белка в порах силикагеля диссоциация гема происходит за 2 – 4 часа даже при pH 2 [33]. Ограничение конформационной подвижности белковой глобулы в порах также может вносить вклад в увеличение стабильности препарата [34]. Кальций-альгинатные микрочастицы могут иметь поры диаметром 5 – 200 нм [35]. На поверхности полученных нами препаратов также присутствуют поры, и некоторые из них имеют наружный диаметр

порядка нескольких нанометров, что сопоставимо с диаметром пероксидазы, который составляет 5 нм [36].

Стабильность иммобилизованных препаратов пероксидазы при хранении. Одним из важнейших факторов, обуславливающих возможность практического применения иммобилизованных ферментов в качестве компонентов лекарственных средств, является их стабильность при хранении. В связи с этим в настоящей работе была изучена зависимость активности полученных препаратов от времени хранения при рН 6,5 и 4°С.

Обнаружено, что полученные препараты иммобилизованного фермента в альгинатном геле отличаются повышенной стабильностью при хранении. Так, активность пероксидазы в гидрогеле, хранившемся в течение месяца, составляет 70% от начальной (рисунок 5). В случае свободного фермента остаточная активность в аналогичных условиях сохраняется только на уровне 19%. Включение фермента в микрочастицы также приводит к его значительной стабилизации. Остаточная активность препарата после 7 месяцев хранения сохраняется на уровне 1,3%, в то время как свободный фермент полностью инактивируется менее чем за 50 суток хранения в растворенном состоянии.

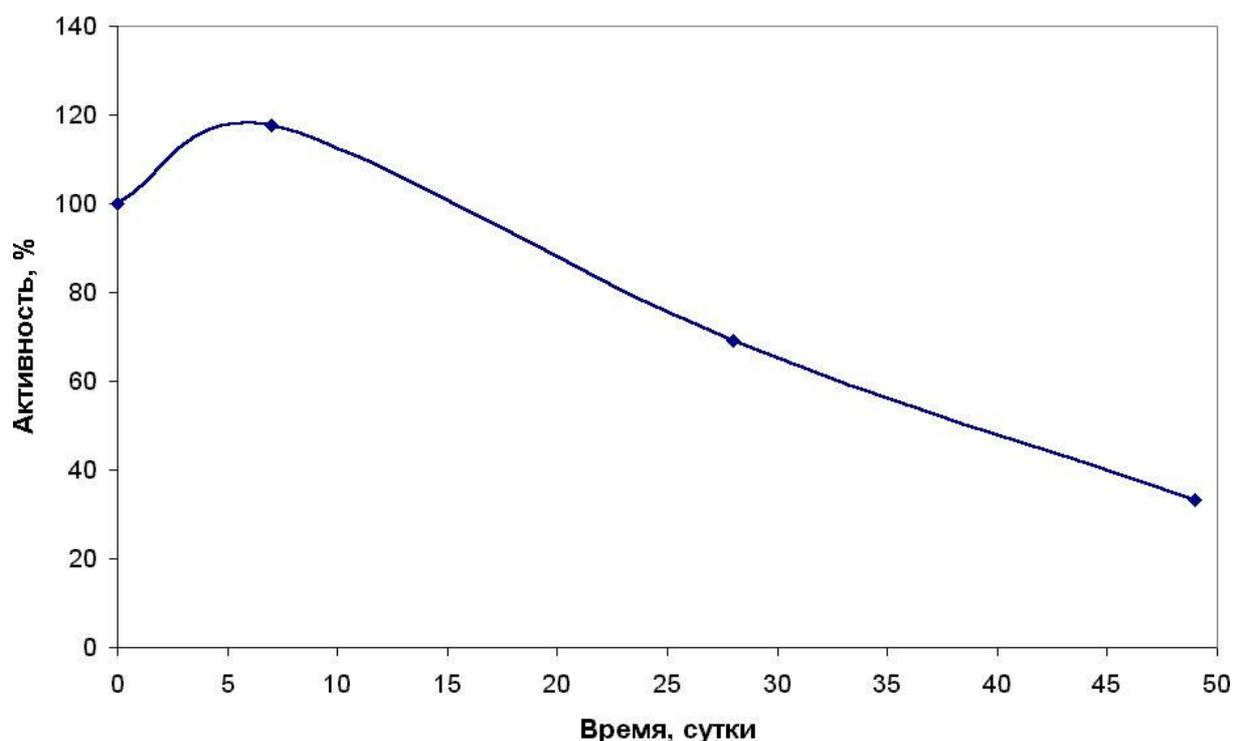


Рисунок 5. Зависимость активности гидрогеля от времени хранения при pH 6,5 и 4°C.

Таким образом, включение пероксидазы в гидрогель на основе альгината кальция, также как и в микрокапсулы на его основе, представляется перспективным для стабилизации фермента как при воздействии внешних факторов, в частности, повышенной температуры, так и при хранении. Результаты проведенного исследования открывают новые перспективы в плане расширения круга практического использования ферментов при разработке новых высокоэффективных биокаталитических систем для применения в медицине и биотехнологии, а также в аналитических целях. В частности, способность гидрогеля к активации дает возможность его использования в качестве носителя в составе препаратов терапевтических ферментов для придания им возможности пролонгированного действия.

Экспериментальная часть

В работе использовали пероксидазу хрена (“Merck”, Германия), альгиновую кислоту (“Fluka”, Германия, $M_r \sim 48000 - 186000$), гидроксид

натрия (“ICN Biomedicals”, США), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (“Sigma”, США), компоненты натрий-фосфатного буферного раствора (“Merck”, Германия), раствор пероксида водорода в субстратном буфере и раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ, ООО “ХимБиоТест”, Россия). Все реактивы использовались без предварительной очистки. Растворы фермента готовили непосредственно перед экспериментом.

Для проведения измерений использовали кюветный спектрофотометр Shimadzu UV-265 FW. pH контролировали на потенциометре Thermo ORION 3 STAR. Образцы центрифугировали на микроцентрифуге Eppendorf 5415 D. Для исследования термостабильности образцов использовали термостат Medingen U7. Размеры микрочастиц и пор определяли с помощью оптического микроскопа Opton ID 02.

Определение содержания нативного фермента в используемом препарате. Концентрацию свободного нативного фермента в используемом растворе определяли по поглощению на 403 нм [31], принимая коэффициент молярного поглощения пероксидазы равным $102000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ и молярную массу пероксидазы равной 44174 Да. Эффективное содержание фермента в иммобилизованных препаратах определяли по калибровочной кривой, представляющей собой зависимость активности свободного фермента от его концентрации в растворе в интервале концентраций 0 – 0,002 мг/мл.

Получение раствора альгината натрия, содержащего пероксидазу. К суспензии 0,9 г альгиновой кислоты в 30 мл воды добавляли при перемешивании 10% раствор NaOH до достижения pH 7,0 – 7,5. К полученному раствору при слабом перемешивании добавляли 10 мл раствора пероксидазы с концентрацией 0,5 мг/мл в 20 мМ натрий-фосфатном буферном растворе, pH 6,5.

Иммобилизация пероксидазы в кальций-альгинатном гидрогеле.

Раствор альгината натрия, содержащий пероксидазу, постепенно добавляли к 100 мл 0,1 М раствора CaCl_2 при перемешивании. Раствор с образовавшимся гидрогелем выдерживали 2 часа при слабом перемешивании, после чего гидрогель отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 13200 об/мин и затем проводили промывку гидрогеля от несвязанного фермента буферным раствором. Промывку с последующим центрифугированием повторяли 3 раза. После центрифугирования без добавления буферного раствора гидрогель отделяли декантацией раствора и использовали его в дальнейшем эксперименте.

Иммобилизация пероксидазы в кальций-альгинатных микрочастицах [1]. Раствор альгината натрия, содержащий пероксидазу, добавляли к 100 мл 0,1 М раствора CaCl_2 с помощью микроразбрызгивателя. После выдерживания в течение 2 часов при слабом перемешивании образовавшиеся микрочастицы отделяли фильтрацией, затем их 3 раза промывали буферным раствором с целью удаления несвязанного фермента. Агрегации полученных микрочастиц при хранении не наблюдается.

Изучение кинетики термоинактивации нативной и иммобилизованной пероксидазы. Образцы гидрогеля (или микрочастиц) под слоем буферного раствора и раствор свободного фермента в натрий-фосфатном буфере, используемый в качестве контроля, инкубировали при 60°C. В различных экспериментах использовались концентрации фермента 0,0002 – 0,0031 мг/мл. Через определенное время отбирали пробы гидрогеля (или микрочастиц) массой 0,001 – 0,002 г и быстро охлаждали их, отделяли гидрогель (или микрочастицы) декантацией раствора и определяли их каталитическую активность как описано ниже.

Определение каталитической активности фермента в растворе. В пластиковую кювету объемом 3 мл вносили 2900 мкл буферного раствора, 10 мкл раствора фермента и 50 мкл раствора ТМБ. Реакцию инициировали добавлением 50 мкл раствора пероксида водорода и регистрировали зависимость оптической плотности при 370 нм от времени. За 1 ед. активности препарата пероксидазы хрена принимали количество фермента, необходимое для увеличения оптической плотности раствора на длине волны 370 нм на одну единицу в реакции окисления ТМБ за 1 мин при 22°C. Ошибка определения составляла 10–15%.

Определение каталитической активности иммобилизованного фермента. К образцу гидрогеля или микрочастиц известной массы добавляли 2900 мкл буферного раствора и 50 мкл раствора ТМБ. Реакцию инициировали 50 мкл раствора пероксида водорода. Через каждые 30 секунд отбирали пробы надосадочной жидкости и регистрировали их оптическую плотность при 370 нм.

Список литературы

1. Silk Coatings on PLGA and Alginate Microspheres for Protein Delivery / Wang X., Wenk E., Hu X., Castro G.R., Meinel L., Wang X., Li C., Merkle H., and Kaplan D.L. // *Biomaterials*. – 2007. – V. 28(28). – P. 4161-4169.
2. Alemzadeh I. Removal of Phenols from Wastewater with Encapsulated Horseradish Peroxidase in Calcium Alginate / Alemzadeh I., Nejati S., and Vossoughi M. // *Engineering Letters*, 17:4, EL_17_4_13
3. Sawada S. Nano-Encapsulation of Lipase by Self-Assembled Nanogels: Induction of High Enzyme Activity and Thermal Stabilization / Sawada S., Akiyoshi K. // *Macromolecular Bioscience*. – 2010. – V. 10. – P. 353-358.
4. Singh R. Artificial envelopment of nonenveloped viruses: enhancing adenovirus tumor targeting in vivo / Singh R., Tian B. and Kostarelos K. // *The FASEB journal*. – 2008. – V. 2. – P. 3389-3402.
5. Santagapita P.R. Formulation and Drying of Alginate Beads for Controlled Release and Stabilization of Invertase / Santagapita P.R., Mazzobre M.F., and Buera M.P. // *Biomacromolecules*. – 2011. DOI: 10.1021/bm2009075
6. Felici M. β -Cyclodextrin-Appended Giant Amphiphile: Aggregation to Vesicle Polymersomes and Immobilization of Enzymes / Felici M., Marzá-Pérez M., Hatzakis N.S., Nolte R.J.M., and Feiters M.C. // *Chem. Eur. J.* – 2008. – V. 14. – P. 9914-9920.

7. Nilsson K. p-Toluenesulfonyl Chloride as an Activating Agent of Agarose for the Preparation of Immobilized Affinity Ligands and Proteins / Nilsson K. and Mosbach K. // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – V. 112. – P. 397-402.
8. Detection of Polyclonal Antibody Against Any Area of the Protein-Antigen Using Immobilized Protein-Antigens: The Critical Role of the Immobilization Protocol / Fuentes M., Mateo C., Fernández-Lafuente R., and Guisán J.M. // *Biomacromolecules.* – 2006. – V. 7. – P. 540-544.
9. Josephy P.D. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates / Josephy P.D., Eling T., and Mason R.P. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V. 257(7). – P. 3669-3675.
10. Antioxidant Effects of Superoxide Dismutase and Horseradish Peroxidase on Lipid Peroxidation / Gao S.-J., Zhao G.-C., Luo G.-M., Yang T.-S., and Shen G.-C. // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1998. – V. 864. – Enzyme Engineering XIV. – P. 284-287.
11. Folkes L.K. Toward targeted “oxidation therapy” of cancer: peroxidase-catalyzed cytotoxicity of indole-3-acetic acids / Folkes L.K., Candeias L.P. and Wardman P. // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.* – 1998. – V. 42(4). – P. 917-920.
12. Folkes L.K. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy / Folkes L.K. and Wardman P. // *Biochemical Pharmacology.* – 2001. – V. 61(2). – P. 129-136.
13. Horseradish Peroxidase-mediated Gene Therapy: Choice of Prodrugs in Oxic and Anoxic Tumor Conditions / Greco O., Rossiter S., Kanthou C., Folkes L.K., Wardman P., Tozer G.M., and Dachs G.U. // *Molecular Cancer Therapeutics.* – 2001. – V. 1. – P. 151-160.
14. Greco O. Gene Directed Enzyme/Prodrug Therapy of Cancer: Historical Appraisal and Future Prospectives / Greco O. and Dachs G.U. // *Journal of Cellular Physiology.* – 2001. – V. 187. – P. 22-36.
15. Mechanisms of Cytotoxicity Induced by Horseradish Peroxidase/Indole-3-Acetic Acid Gene Therapy / Greco O., Dachs G.U., Tozer G.M. and Kanthou C. // *Journal of Cellular Biochemistry.* – 2002. – V. 87. – P. 221-232.
16. Rossiter S. Halogenated Indole-3-acetic Acids as Oxidatively Activated Prodrugs with Potential for Targeted Cancer Therapy / Rossiter S., Folkes L.K. and Wardman P. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* – 2002. – V. 12. – P. 2523-2526.
17. Kim D.-S. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells / Kim D.-S., Jeon S.-E., Park K.-C. // *Cellular Signalling.* – 2004. – V. 16. – P. 81-88.
18. Tafazoli S. Prooxidant Activity and Cytotoxic Effects of Indole-3-Acetic Acid Derivative Radicals / Tafazoli S. and O'Brien P.J. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2004. – V. 17. – P. 1350-1355.
19. Analysis of the horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid combination in a three-dimensional tumor model / Tupper J., Greco O., Tozer G.M., and Dachs G.U. // *Cancer Gene Therapy.* – 2004. – V. 11. – P. 508-513.
20. Dachs G.U. From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer / Dachs G.U. // *Anti-Cancer Drugs.* – 2005. – V. 16(4). – P. 349-359.
21. Liu Q. Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-adsorption-polyelectrolyte coating method / Liu Q., Rauth A.M., Wu X.Y. // *International Journal of Pharmaceutics.* – 2007. – V. 339. – P. 148-156.

22. Pancreatic Cell Immobilization in Alginate Beads Produced by Emulsion and Internal Gelation / Hoesli C.A., Raghuram K., Kiang R.L.J., Mocinecová D., Hu X., Johnson J.D., Lacík I., Kieffer T.J., Piret J.M. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2011. – V. 108(2). – P. 424-434.
23. Poncelet D. Producing of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation / Poncelet D. // *Annals New York Academy of Sciences*. – 2001. – V. 944. – P. 74-82.
24. External Versus Internal Source of Calcium During the Gelation of Alginate Beads for DNA Encapsulation / Quong D., Neufeld R.J., Skjåk-Bræk G., Poncelet D. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1998. – V. 57(4). – P. 438-446.
25. Holzbaur I.E. FTIR Study of the Thermal Denaturation of Horseradish and Cytochrome c Peroxidases in D₂O / Holzbaur I.E., English A.M., and Ismail A.A. // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – P. 5488-5494.
26. Narayanan J. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques / Narayanan J., Xiong J.-Y. and Liu X.-Y. // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2006. – V. 28. – P. 83-86.
27. Enzyme-polyelectrolyte complexes in water-cosolvent mixtures. Negatively charged groups artificially introduced into α -chymotrypsin provide additional activation and stabilization effects / E.V. Kudryashova, A.K. Gladilin, A.V. Vakurov, F. Heitz, A.V. Levashov, V.V. Mozhaev // *Biotechnology & Bioengineering*. – 1997. – V. 55(2). – P. 267-277.
28. Enzyme-polyelectrolyte noncovalent complexes as catalysts in binary mixtures of polar organic solvents with water / A.K. Gladilin, E.V. Kudryashova, A.V. Vakurov, V.A. Izumrudov, V.V. Mozhaev, A.V. Levashov // *Biotechnol. Lett.* – 1995. – V. 17. – P. 1329-1334.
29. Formation of Quasi-Regular Compact Structure of Poly(methacrylic acid) upon an Interaction with Chymotrypsin / E.V. Kudryashova, A.K. Gladilin, V.A. Izumrudov, A. van Hoek, A.J.W.G. Visser, A.V. Levashov // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2001. – V. 1550(2). – P. 129-143.
30. Plant peroxidases. Biochemistry and physiology. C. Obinger, U. Burner, H. Grippin, eds. Geneva, 1996. P. 390-395.
31. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М., Высшая школа, 1991. 288 с.
32. Identification of an Extracellular Polysaccharide Network Essential for Cytochrome Anchoring and Biofilm Formation in *Geobacter sulfurreducens* / Rollefson J.B., Stephen C.S., Tien M., and Bond D.R. // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193(5). – P. 1023-1033.
33. Folding Myoglobin within a Sol-Gel Glass: Protein Folding Constrained to a Small Volume / Peterson E.S., Leonard E.F., Foulke J.A., Oliff M.C., Salisbury R.D., and Kim D.Y. // *Biophysical Journal*. – 2008. – V. 95. – P. 322-332.
34. Биотехнология. Кн. 7. Иммуобилизованные ферменты. Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. М., Высшая школа, 1987. 159 с.
35. Hannoun B. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes / Hannoun B., Stephanopoulos G. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1986. – V. 28. – P. 829-835.
36. Clementi F. Intestinal Capillaries. I. Permeability to Peroxidase and Ferritin / Clementi F. and Palade G.E. // *J. Cell Biol.* – 1969. – V. 41. – P. 33-58.

References

1. Silk Coatings on PLGA and Alginate Microspheres for Protein Delivery / Wang X., Wenk E., Hu X., Castro G.R., Meinel L., Wang X., Li C., Merkle H., and Kaplan D.L. // *Biomaterials*. – 2007. – V. 28(28). – P. 4161-4169.
2. Alemzadeh I. Removal of Phenols from Wastewater with Encapsulated Horseradish Peroxidase in Calcium Alginate / Alemzadeh I., Nejati S., and Vossoughi M. // *Engineering Letters*, 17:4, EL_17_4_13
3. Sawada S. Nano-Encapsulation of Lipase by Self-Assembled Nanogels: Induction of High Enzyme Activity and Thermal Stabilization / Sawada S., Akiyoshi K. // *Macromolecular Bioscience*. – 2010. – V. 10. – P. 353-358.
4. Singh R. Artificial envelopment of nonenveloped viruses: enhancing adenovirus tumor targeting in vivo / Singh R., Tian B. and Kostarelos K. // *The FASEB journal*. – 2008. – V. 2. – P. 3389-3402.
5. Santagapita P.R. Formulation and Drying of Alginate Beads for Controlled Release and Stabilization of Invertase / Santagapita P.R., Mazzobre M.F., and Buera M.P. // *Biomacromolecules*. – 2011. DOI: 10.1021/bm2009075
6. Felici M. β -Cyclodextrin-Appended Giant Amphiphile: Aggregation to Vesicle Polymersomes and Immobilization of Enzymes / Felici M., Marzá-Pérez M., Hatzakis N.S., Nolte R.J.M., and Feiters M.C. // *Chem. Eur. J.* – 2008. – V. 14. – P. 9914-9920.
7. Nilsson K. p-Toluenesulfonyl Chloride as an Activating Agent of Agarose for the Preparation of Immobilized Affinity Ligands and Proteins / Nilsson K. and Mosbach K. // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – V. 112. – P. 397-402.
8. Detection of Polyclonal Antibody Against Any Area of the Protein-Antigen Using Immobilized Protein-Antigens: The Critical Role of the Immobilization Protocol / Fuentes M., Mateo C., Fernández-Lafuente R., and Guisán J.M. // *Biomacromolecules*. – 2006. – V. 7. – P. 540-544.
9. Josephy P.D. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates / Josephy P.D., Eling T., and Mason R.P. // *J. Biol. Chem.* – 1982. – V. 257(7). – P. 3669-3675.
10. Antioxidant Effects of Superoxide Dismutase and Horseradish Peroxidase on Lipid Peroxidation / Gao S.-J., Zhao G.-C., Luo G.-M., Yang T.-S., and Shen G.-C. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1998. – V. 864. – Enzyme Engineering XIV. – P. 284-287.
11. Folkes L.K. Toward targeted “oxidation therapy” of cancer: peroxidase-catalyzed cytotoxicity of indole-3-acetic acids / Folkes L.K., Candeias L.P. and Wardman P. // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 1998. – V. 42(4). – P. 917-920.
12. Folkes L.K. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy / Folkes L.K. and Wardman P. // *Biochemical Pharmacology*. – 2001. – V. 61(2). – P. 129-136.
13. Horseradish Peroxidase-mediated Gene Therapy: Choice of Prodrugs in Oxic and Anoxic Tumor Conditions / Greco O., Rossiter S., Kanthou C., Folkes L.K., Wardman P., Tozer G.M., and Dachs G.U. // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2001. – V. 1. – P. 151-160.
14. Greco O. Gene Directed Enzyme/Prodrug Therapy of Cancer: Historical Appraisal and Future Prospectives / Greco O. and Dachs G.U. // *Journal of Cellular Physiology*. – 2001. – V. 187. – P. 22-36.
15. Mechanisms of Cytotoxicity Induced by Horseradish Peroxidase/Indole-3-Acetic Acid Gene Therapy / Greco O., Dachs G.U., Tozer G.M. and Kanthou C. // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2002. – V. 87. – P. 221-232.

16. Rossiter S. Halogenated Indole-3-acetic Acids as Oxidatively Activated Prodrugs with Potential for Targeted Cancer Therapy / Rossiter S., Folkes L.K. and Wardman P. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2002. – V. 12. – P. 2523-2526.
17. Kim D.-S. Oxidation of indole-3-acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells / Kim D.-S., Jeon S.-E., Park K.-C. // *Cellular Signalling*. – 2004. – V. 16. – P. 81-88.
18. Tafazoli S. Prooxidant Activity and Cytotoxic Effects of Indole-3-Acetic Acid Derivative Radicals / Tafazoli S. and O'Brien P.J. // *Chem. Res. Toxicol.* – 2004. – V. 17. – P. 1350-1355.
19. Analysis of the horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid combination in a three-dimensional tumor model / Tupper J., Greco O., Tozer G.M., and Dachs G.U. // *Cancer Gene Therapy*. – 2004. – V. 11. – P. 508-513.
20. Dachs G.U. From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer / Dachs G.U. // *Anti-Cancer Drugs*. – 2005. – V. 16(4). – P. 349-359.
21. Liu Q. Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-adsorption-polyelectrolyte coating method / Liu Q., Rauth A.M., Wu X.Y. // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2007. – V. 339. – P. 148-156.
22. Pancreatic Cell Immobilization in Alginate Beads Produced by Emulsion and Internal Gelation / Hoesli C.A., Raghuram K., Kiang R.L.J., Mocinecová D., Hu X., Johnson J.D., Lacík I., Kieffer T.J., Piret J.M. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2011. – V. 108(2). – P. 424-434.
23. Poncelet D. Producing of Alginate Beads by Emulsification/Internal Gelation / Poncelet D. // *Annals New York Academy of Sciences*. – 2001. – V. 944. – P. 74-82.
24. External Versus Internal Source of Calcium During the Gelation of Alginate Beads for DNA Encapsulation / Quong D., Neufeld R.J., Skjåk-Bræk G., Poncelet D. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1998. – V. 57(4). – P. 438-446.
25. Holzbaur I.E. FTIR Study of the Thermal Denaturation of Horseradish and Cytochrome c Peroxidases in D₂O / Holzbaur I.E., English A.M., and Ismail A.A. // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – P. 5488-5494.
26. Narayanan J. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques / Narayanan J., Xiong J.-Y. and Liu X.-Y. // *Journal of Physics: Conference Series*. – 2006. – V. 28. – P. 83-86.
27. Enzyme-polyelectrolyte complexes in water-cosolvent mixtures. Negatively charged groups artificially introduced into α -chymotrypsin provide additional activation and stabilization effects / E.V. Kudryashova, A.K. Gladilin, A.V. Vakurov, F. Heitz, A.V. Levashov, V.V. Mozhaev // *Biotechnology & Bioengineering*. – 1997. – V. 55(2). – P. 267-277.
28. Enzyme-polyelectrolyte noncovalent complexes as catalysts in binary mixtures of polar organic solvents with water / A.K. Gladilin, E.V. Kudryashova, A.V. Vakurov, V.A. Izumrudov, V.V. Mozhaev, A.V. Levashov // *Biotechnol. Lett.* – 1995. – V. 17. – P. 1329-1334.
29. Formation of Quasi-Regular Compact Structure of Poly(methacrylic acid) upon an Interaction with Chymotrypsin / E.V. Kudryashova, A.K. Gladilin, V.A. Izumrudov, A. van Hoek, A.J.W.G. Visser, A.V. Levashov // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2001. – V. 1550(2). – P. 129-143.
30. Plant peroxidases. Biochemistry and physiology. C. Obinger, U. Burner, H. Grippin, eds. Geneva, 1996. P. 390-395.

31. Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilova E.M. Teorija i praktika immunofermentnogo analiza. M., Vysshaja shkola, 1991. 288 s.
32. Identification of an Extracellular Polysaccharide Network Essential for Cytochrome Anchoring and Biofilm Formation in *Geobacter sulfurreducens* / Rollefson J.B., Stephen C.S., Tien M., and Bond D.R. // *Journal of Bacteriology*. – 2011. – V. 193(5). – P. 1023-1033.
33. Folding Myoglobin within a Sol-Gel Glass: Protein Folding Constrained to a Small Volume / Peterson E.S., Leonard E.F., Foulke J.A., Oliff M.C., Salisbury R.D., and Kim D.Y. // *Biophysical Journal*. – 2008. – V. 95. – P. 322-332.
34. Biotehnologija. Kn. 7. Immobilizovannye fermenty. Pod red. N.S. Egorova, V.D. Samuilova. M., Vysshaja shkola, 1987. 159 s.
35. Hannoun B. Diffusion coefficients of glucose and ethanol in cell-free and cell-occupied calcium alginate membranes / Hannoun B., Stephanopoulos G. // *Biotechnol. Bioeng.* – 1986. – V. 28. – P. 829-835.
36. Clementi F. Intestinal Capillaries. I. Permeability to Peroxidase and Ferritin / Clementi F. and Palade G.E. // *J. Cell Biol.* – 1969. – V. 41. – P. 33-58.