

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии
наименование кафедры

**Контролируемое высвобождение веществ из массивов
микроконтейнеров**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента (ки) 2 курса 251 группы

направления (специальности) 04.04.01 «Химия»
код и наименование направления (специальности)

Институт химии

наименование факультета, института, колледжа
Мордовиной Екатерины Алексеевны
фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
проф. кафедры, д.х.н., проф.
должность, уч. степень, уч. звание

Тер 16.06.21
подпись, дата

И.Ю.Горячева
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой
д.х.н., проф.
должность, уч. степень, уч. звание

Черк 16.06.21
подпись, дата

Д.Г. Черкасов
инициалы, фамилия

Введение

Актуальность работы. Создание систем для контролируемой доставки лекарственных препаратов является перспективным научным направлением в последние годы, поскольку использование таких систем позволяет значительно повысить терапевтический эффект и снизить негативное воздействие сильнодействующих препаратов на здоровые ткани организма.

Массивы микроконтейнеров – это относительно новая, перспективная система доставки веществ, позволяющая инкапсулировать как низкомолекулярные, так и высокомолекулярные соединения. Использование биоразлагаемых и биосовместимых соединений при их конструировании открывает возможность их дальнейшего применения в медицине.

Существует ряд параметров, позволяющих добиться контролируемого высвобождения веществ из массивов микроконтейнеров, наиболее интересным из которых является использование лазерного излучения ИК-диапазона. Для придания чувствительности к лазерному излучению, при конструировании таких систем доставки необходимо использовать фотопоглощающие агенты, в качестве которых могут выступать углеродные наночастицы.

Целью данной работы является создание массивов микроконтейнеров на основе композита полимолочной кислоты и углеродных наночастиц, чувствительных к инфракрасному лазеру, для инкапсулирования биологически активных веществ – ферментов.

Практическая значимость. Инкапсуляция ферментов представляет собой сложную задачу, поскольку существует множество факторов, влияющих на их стабильность и ферментативную активность. В свою очередь, создание полимерных микроконтейнеров предполагает минимальное воздействие на активное вещество, поскольку его инкапсуляция происходит на последнем этапе их формирования и предполагает только высушивание вещества при комнатной температуре и последующее запечатывание.

Научная новизна данной работы заключается в разработке и оптимизации системы для доставки веществ на основе полимерных

микроконтейнеров, функционализированных углеродными наночастицами, которые в свою очередь позволяют герметично удерживать биологически активные вещества (ферменты) и высвободить их при необходимости.

Структура и объем работы. Работа включает в себя список сокращений, введение, 2 основные главы (6 разделов), заключение, технику безопасности и список используемых источников, состоящий из 48 наименований. Работа изложена на 52 листах, включает 24 рисунка.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность темы работы, изложена научная новизна и практическая значимость.

В первой главе представлен литературный обзор, в котором описаны наиболее перспективные системы для контролируемой доставки веществ, представлены основные подходы к конструированию массивов микроконтейнеров и параметры, позволяющие осуществлять контролируемое высвобождение веществ из них. Литературный обзор включает информацию о способах синтеза углеродных наночастиц, как источника тепловой энергии для высвобождения веществ из микроконтейнеров. Так же в литературном обзоре описаны известные способы инкапсуляции ферментов и их недостатки.

Во второй главе представлено описание используемого оборудования и реагентов, описаны методики проведения экспериментов и полученные результаты.

Для синтеза УНЧ был выбран гидротермальный метод, основанный на термической обработке водных растворов углеродного сырья в замкнутом объеме (рисунок 1 (А)).

Для получения ПЛА, содержащего УНЧ, необходимо высушить полученные УНЧ. Для этого в чашку Петри порциями прикапывали УНЧ с этанолом и сушили в сушильном шкафу при 50-60°C до полного испарения жидкости. Полученный порошок помещали в стеклянную баночку, добавляли 15 мл хлороформа и навеску ПЛА, соответствующую 1%. (рисунок 1 (Б)).

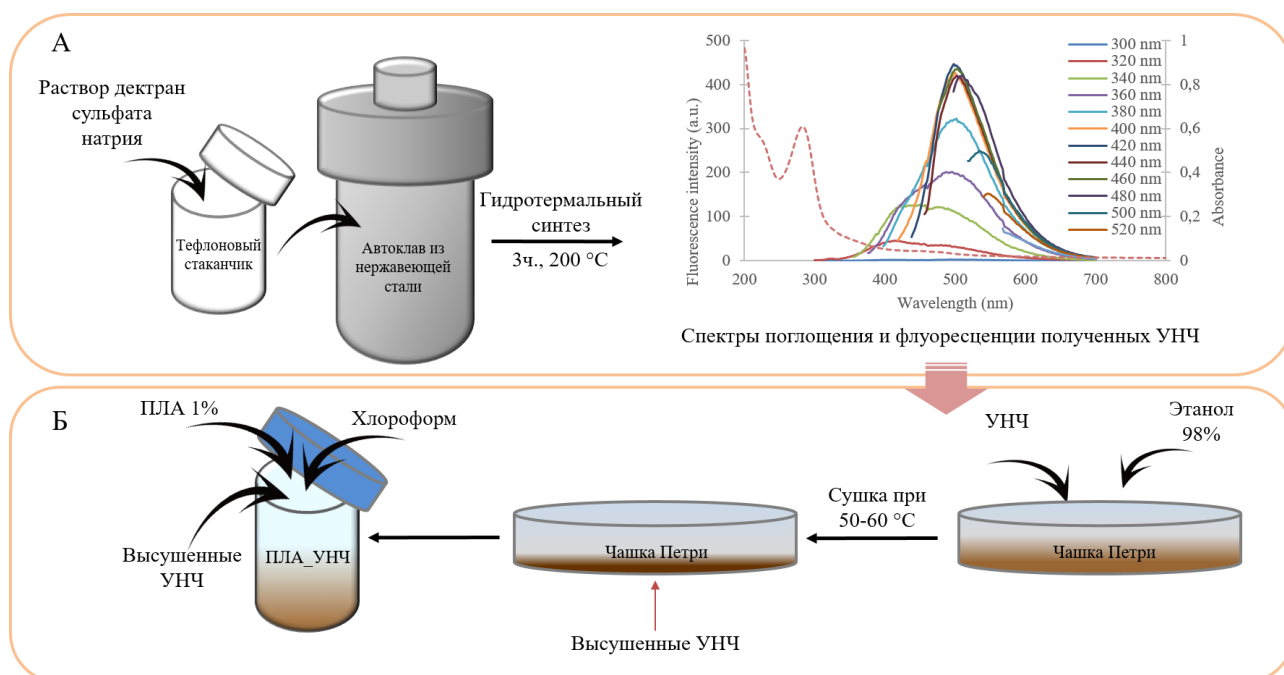


Рисунок 1 – Схема синтеза углеродных наночастиц (А) и приготовление композита полимолочной кислоты и углеродных наночастиц (Б)

ММК были синтезированы с помощью ПДМС-штампа с рельефом в виде упорядоченного массива микроразмерных лунок, который был покрыт тонкой пленкой полимолочной кислоты, функционализированной углеродными наночастицами (ПЛА_УНЧ) с целью придания чувствительности к воздействию лазерного излучения.

Для синтеза микроконтейнеров (схема на рисунке 2) ПДМС-штамп помещали в композит ПЛА_УНЧ и высушивали на нем тонкую равномерную пленку с микролунками. Затем, на поверхность пленки помещали 1 μ л водного раствора фермента и равномерно распределяли с помощью наконечника пипет-дозатора до полного испарения жидкости. Таким образом, в микролунки композитной пленки были «загружены» кристаллы фермента. Параллельно подготавливали покровное стекло с равномерно нанесенной пленкой ПЛА, на которой отпечатывали массив микроконтейнеров.

СЭМ изображения пленки ПЛА_УНЧ на ПДМС-штампе и массива пустых микроконтейнеров представлены на рисунке 2.

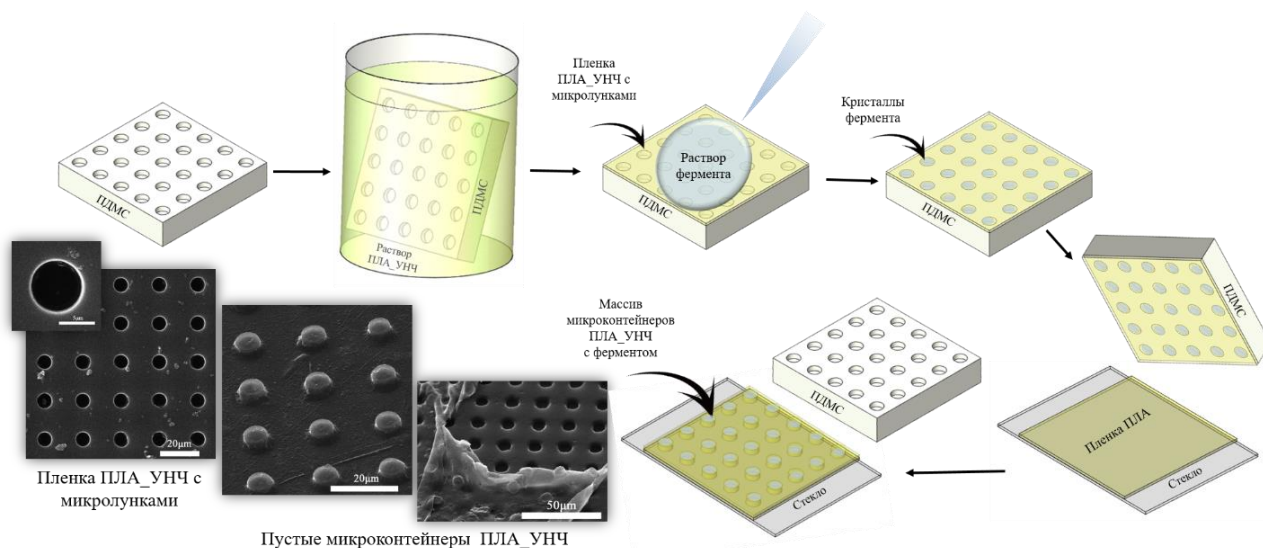


Рисунок 2 – Схема формирования массива микроконтейнеров из композита полимолочной кислоты и углеродных наночастиц, содержащих фермент в качестве «груза»; СЭМ-изображения пленки с микролунками и пустых микроконтейнеров

Для оценки ферментативного действия α -амилазы на крахмал и его комплекс с йодом было проведено колориметрическое определение по схеме на рисунке 3 слева. Для этого 0,5% раствор крахмала раскапывали по 100 μ л в лунки микропланшета, после чего к контрольным лункам (красная область на рисунке 3) добавляли по 10 μ л разбавленного в 100 раз раствора люголя и бидистиллированной воды. Для оценки действия фермента на йодкрахмальный комплекс, в лунки к крахмалу добавляли по 10 μ л люголя и α -амилазы различной концентрации (желтая область на рисунке 3). Для оценки действия фермента на крахмал, в лунки к крахмалу добавляли по 10 μ л α -амилазы различной концентрации (зеленая область на рисунке 3). Спустя 30 минут к лункам зеленой области добавляли по 10 μ л люголя и наблюдали окраску растворов во всех лунках.

В результате взаимодействия α -амилазы и крахмала, при последующем добавлении йода, а также α -амилазы и йодкрахмального комплекса происходит изменение интенсивности окраски, что свидетельствует о ферментативной деструкции крахмала и его комплекса с йодом (рисунок 3 справа).

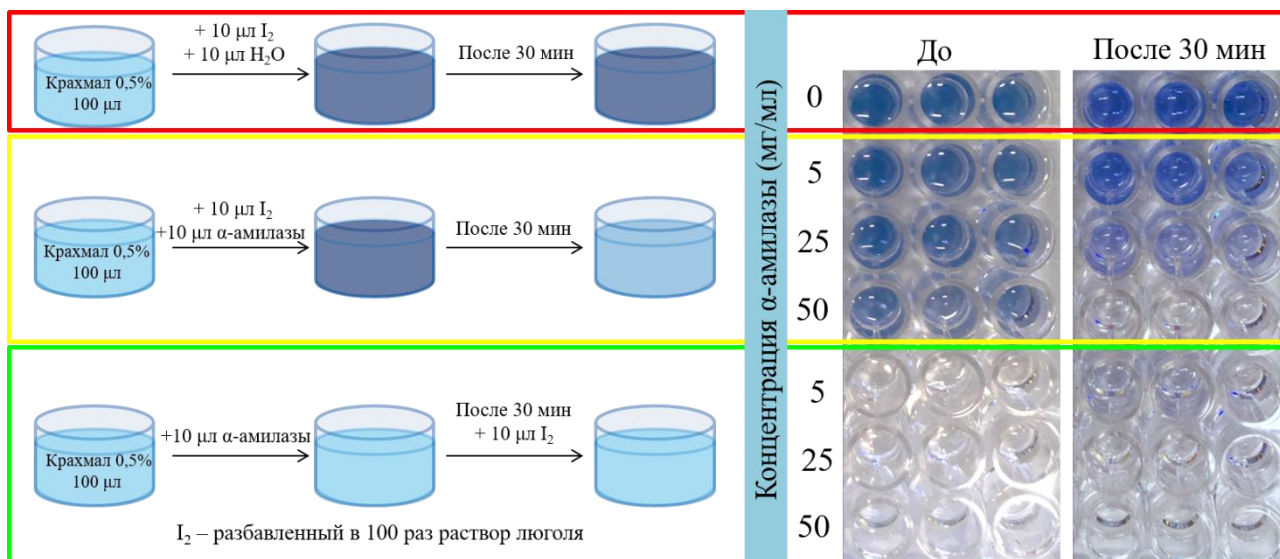


Рисунок 3 - Колориметрическое определение ферментативного действия α -амилазы на крахмал и его комплекс с йодом (слева: схема определения, справа: результат определения)

Согласно литературным данным, определение α -амилазы йодометрическим методом предполагает предварительный гидролиз крахмала и проведение реакции между продуктами гидролиза и йодом. Возможность разрушения йодкрахмального комплекса ферментом не описана в литературе.

Таким образом, для отслеживания высвобождения α -амилазы из ММК был выбран подход, предполагающий обесцвечивание йодкрахмального комплекса под действием фермента (рисунок 4). Это позволит наблюдать за течением ферментативной реакции без дополнительных этапов, позволяющих визуализировать процесс.

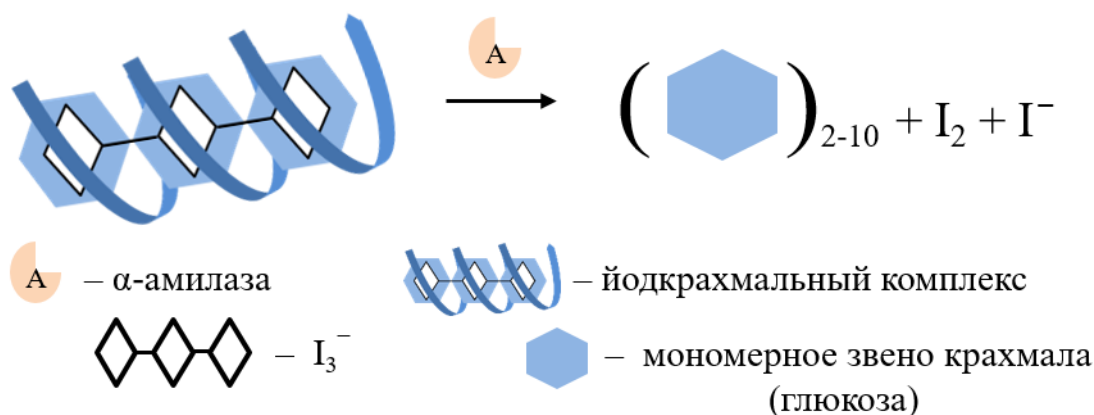


Рисунок 4 – Схема взаимодействия комплекса йод-крахмал с α -амилазой

Присутствие УНЧ в рельефной пленке ПЛА может повлиять на герметичность ММК с α -амилазой. В связи с этим необходимо оценить спонтанное высвобождение α -амилазы из микроконтейнеров без дополнительного внешнего воздействия.

Для этого на ММК с α -амилазой в качестве «груза» были нанесены адгезивные гидрофобные барьеры с фиксированной толщиной 120 μm , после чего на их поверхность прикапывали 8 μl смеси 0,5% крахмала с йодом, взятых в соотношении 1/100 и выдерживали 1 час (рисунок 5 (А)). После этого наблюдали изменение интенсивности окраски.

При контакте микроконтейнеров с водным раствором крахмала и йода изменение цвета не происходит, что свидетельствует об отсутствии спонтанного высвобождения α -амилазы из ММК (рисунок 5 (Б)).

После этого образец подвергали ультразвуковому воздействию (известный внешний фактор, приводящий к высвобождению веществ из носителя). При этом визуальное изменение цвета происходит постепенно, а через 15 минут воздействия происходит обесцвечивание йодкрахмального комплекса (рисунок 5 (Б)).

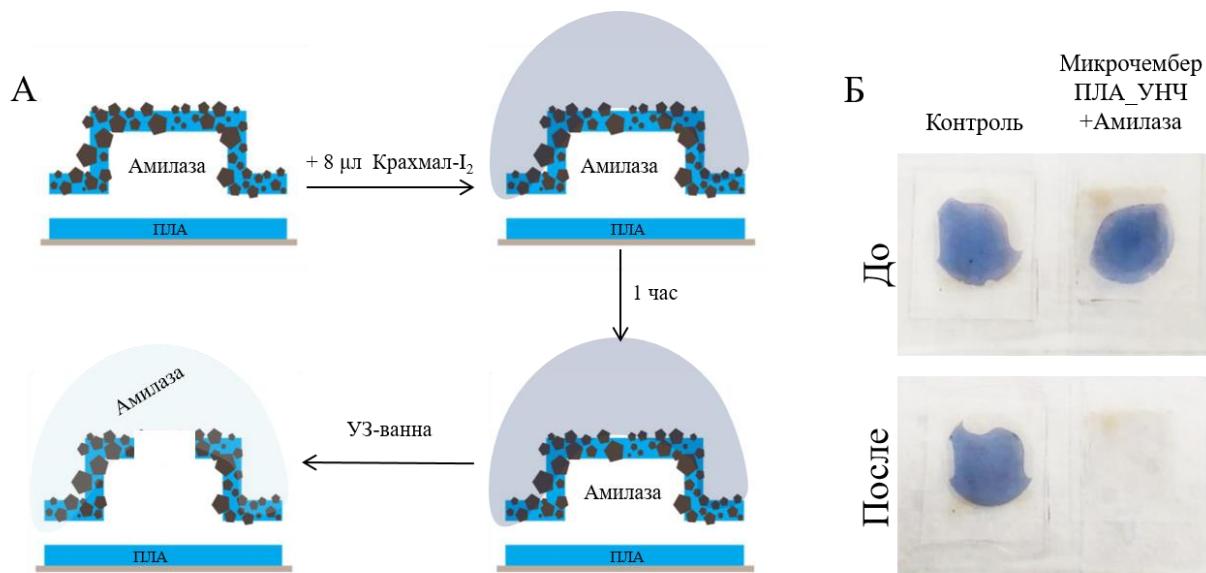


Рисунок 5 – Колориметрическая оценка спонтанного высвобождения α -амилазы из массивов микроконтейнеров на основе композита полимолочной кислоты и углеродных наночастиц (А – схема; Б – результат)

Таким образом, ММК на основе ПЛА_УНЧ позволяют герметично инкапсулировать α -амилазу, при этом ее активность сохраняется.

Наличие УНЧ в полимерной рельефной пленке делает ММК чувствительными к лазерному воздействию. При поглощении лазерного излучения наночастицами происходит локальный нагрев поверхности ММК и, как следствие, ее разрушение.

Для вскрытия микроконтейнеров был выбран инфракрасный (1064 нм) импульсный лазер с частотой 3 кГц, мощностью 1,5 Вт и длительностью импульса 2 нс. Образцы ММК были приготовлены аналогично предыдущему пункту, схема контролируемого высвобождения фермента демонстрируется на рисунке 6 (А).

Чтобы исключить влияние лазерного и термического воздействий на интенсивность окраски комплекса крахмала и йода или активность фермента, были приготовлены контрольные образцы. В качестве контроля мы использовали три образца: пустой ММК из ПЛА и ПЛА_УНЧ, а также ММК из ПЛА с α -амилазой в качестве «груза». Для всех образцов с помощью оптического микроскопа были получены изображения до и после лазерного воздействия. Полученные изображения обрабатывались с помощью программы *Adobe Photoshop SC6 Extended* (функция «карта градиента», которая позволяет провести замену темных и светлых оттенков изображения необходимыми). Градиентные карты полученных изображений представлены на рисунке 6 (Б,В).

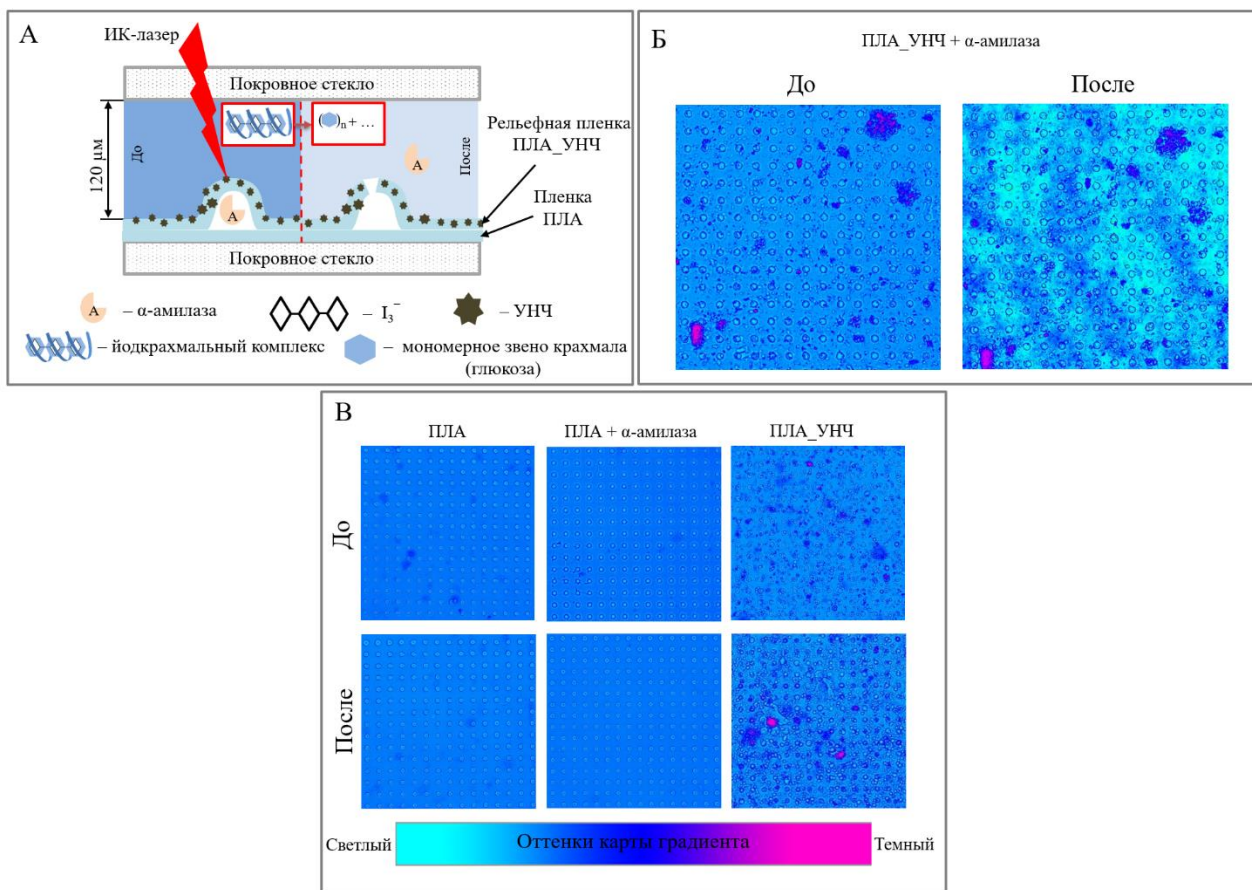


Рисунок 6 – Схема контролируемого лазером вскрытия микрокамер с последующим протеканием ферментативной реакции (А); градиентные карты изображений образцов, полученных на микроскопе *Olympus* (Б – экспериментальный образец; В – контрольные образцы)

В результате лазерного воздействия на ММК, включающих УНЧ, происходит неравномерное обесцвечивание комплекса крахмала с йодом, что свидетельствует о высвобождении фермента и сохранении его биологической активности (рисунок 6 (Б)). Для контрольных образцов (рисунок 6 (В)), которые подвергались аналогичному воздействию лазера, данных изменений не наблюдается.

Таким образом, мы показали, что ММК на основе композита ПЛА и УНЧ герметично удерживают α-амилазу (спонтанного высвобождения не происходит), тогда как под действием инфракрасного лазера фермент высвобождается из ММК. Следует отметить, что биологическая активность α-амилазы на всех этапах сохраняется.

ПХ окисляет ТМБ в присутствии пероксида водорода, что затрудняет наблюдение ферментативной реакции в реальном времени, поскольку при контакте ММК на основе ПЛА_УНЧ, содержащих ПХ в качестве «груза», происходит мгновенное проявление ферментативной реакции (рисунок 7). Это связано с тем, что происходит разрушение полимерной пленки и как следствие высвобождением фермента. Желтая окраска продукта ферментативной реакции обусловлена значительным избытком ПХ.

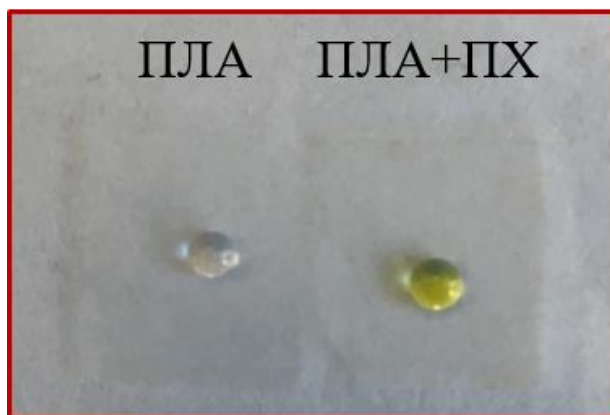


Рисунок 7 – Фотографии пустых массивов микроконтейнеров (слева) и содержащих пероксидазу хрена в качестве «груза» (справа) после добавления на их поверхность субстрата

В связи с этим, наблюдение высвобождения ПХ из ММК проводили путем проведения ферментативной реакции между водной средой на поверхности помещены ММК с ПХ в качестве «груза», и ТМБ-субстратом.

Для возможности количественного определения высвободившегося фермента из ММК, была построена зависимость оптической плотности при 450 нм (конечный продукт окисления ТМБ) от концентрации ПХ.

Для этого в лунки микропланшета раскапывали по 50 $\mu\text{л}$ ПХ, концентрации от 1 $\mu\text{г}/\text{мл}$ до 1 $\text{пкг}/\text{мл}$, после чего добавляли 50 $\mu\text{л}$ ТМБ-субстрата и оставляли на 10 минут. Для остановки ферментативной реакции добавляли 50 $\mu\text{л}$ 0.1M H_2SO_4 и детектировали оптическую плотность при 450 нм (рисунок 8).

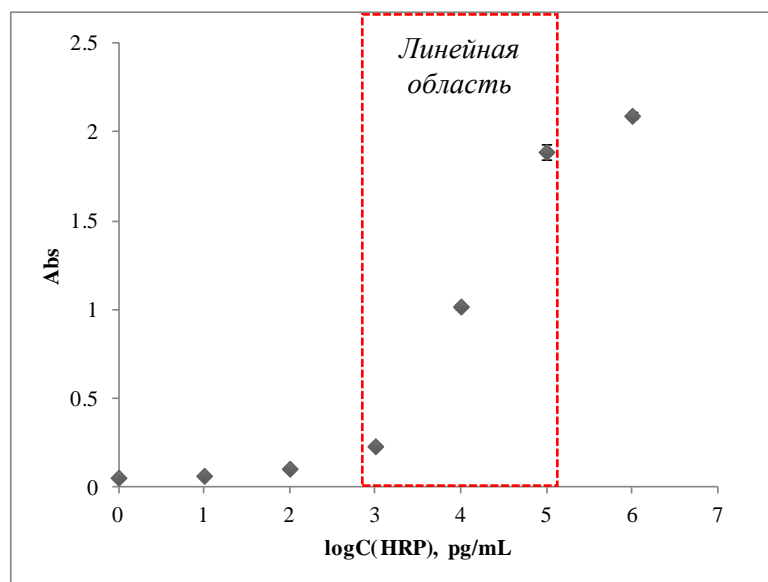


Рисунок 8 – Зависимость оптической плотности при 450 нм от логарифма концентрации пероксидазы хрена

При высоких и низких концентрациях нарушается линейность зависимости и количественное определение невозможно, оптимальные концентрации фермента составляют 0.1 – 0.001 $\mu\text{г/мл}$.

Для оценки спонтанного высвобождения ПХ (рисунок 9 (А)) из микроконтейнеров, на поверхность ММК с ПХ в качестве «груза» прикапывали 100 $\mu\text{л}$ бидистиллированной воды и оставляли на 30 минут. После этого, отбирали жидкость с поверхности и проводили определение ПХ аналогично прошлому пункту (рисунок 9, справа).

В результате определения, концентрация ПХ в отобранной жидкости превышала концентрации линейной области на рисунке 8. Исходя из этих данных можно сделать вывод, что полимерная пленка, приготовленная из композита ПЛА и УНЧ не позволяет герметично инкапсулировать ПХ.

Для эффективной инкапсуляции веществ в ММК, как правило, используются высокие концентрации веществ (мг), что значительно превышает рабочую концентрацию ПХ. В связи с этим, с целью понижения концентрации ПХ и сохранения эффективности инкапсуляции, ПХ разбавляли раствором 1% бычьего сывороточного альбумин (БСА) (рисунок 9). Таким образом, удалось уменьшить концентрацию ПХ до 1 $\mu\text{г/мл}$ (1 нг ПХ на ММК).

После инкапсуляции ПХ_БСА в ММК на их поверхность прикапывали 100 μ л бидистиллированной воды и оставляли на 30 минут. После этого, отбирали жидкость с поверхности и проводили определение ПХ.

Снижение концентрации ПХ не позволяет эффективно инкапсулировать фермент в композитные пленки ПЛА_УНЧ, поскольку спустя 30 минут определенная концентрация ПХ находится вне линейной области калибровочной кривой и соответствует загруженной концентрации.

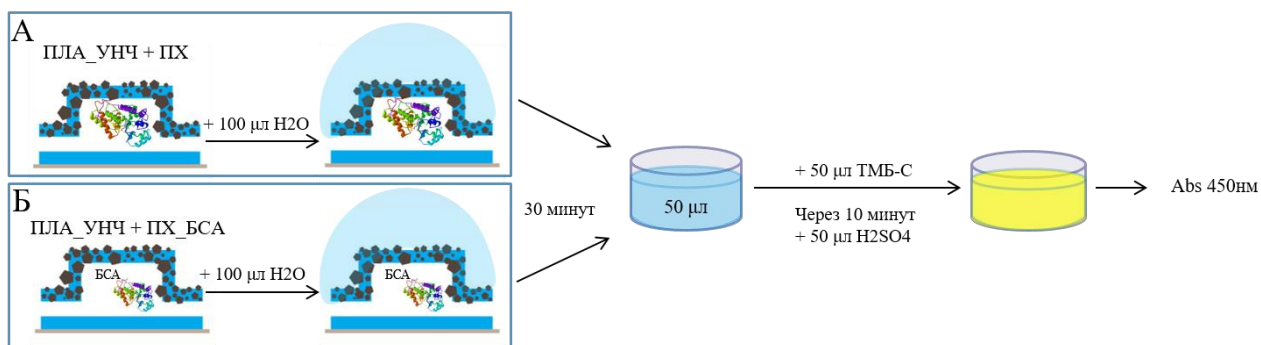


Рисунок 9 – Схема оценки спонтанного высвобождения пероксидазы хрена и ее смеси с бычим сывороточным альбумином из массивов микроконтейнеров

Таким образом, использование композита ПЛА и УНЧ не позволяет герметично инкапсулировать ПХ.

Заключение

В результате выполнения работы была предложена схема формирования массивов микроконтейнеров на основе композита полимолочной кислоты и углеродных наночастиц. Наличие углеродных наночастиц в рельефной пленке микроконтейнеров делает их чувствительными к инфракрасному лазеру.

Для инкапсуляции в полученные массивы микроконтейнеров были выбраны два фермента различной природы и близкой молекулярной массы (α -амилаза и пероксидаза хрена). Для визуализации высвобождения ферментов из массивов микроконтейнеров был использован колориметрический и спектрофотометрический методы.

Определение α -амилазы проводилось йодометрическим методом, который заключается в гидролизе крахмала под действием фермента, что делает его недоступным для образования сине-фиолетового комплекса с йодом. Определение пероксидазы хрена проводили с использованием 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин – субстрата, продукт окисления которого детектировали спектрофотометрически.

В результате оценки спонтанного высвобождения ферментов из массивов микроконтейнеров демонстрируется, что полимерные пленки на основе композита полимолочной кислоты и углеродных наночастиц герметично удерживают α -амилазу и не подходят для инкапсуляции пероксидазы хрена.

Исследование возможности высвобождения фермента из массива микроконтейнеров под действием инфракрасного лазера демонстрирует эффективное высвобождение α -амилазы, что подтверждается обесцвечиванием комплекса крахмала с йодом, а также сохранение активности фермента.

Таким образом, в работе были представлены массивы микроконтейнеров на основе полимолочной кислоты и углеродных наночастиц, как система, позволяющая герметично удерживать и контролируя лазером высвободить α -амилазу, следует отметить, что лазерное излучение не оказывает негативного воздействия на инкапсулированный фермент. Однако, данные

микроконтейнеры не подходят для инкапсуляции пероксидазы хрена, что может быть связано деструкцией микрокамер под действием фермента.

Список используемых источников

1. Koker, S. Polymeric multilayer capsules for drug delivery / S. Koker, R. Hoogenboom, B.G. Geest // *Chem. Soc. Rev.* - 2012. - Vol. 41, № 7. - P. 2867–2884.
2. Timko, B.P. Remotely Triggerable Drug Delivery Systems / B.P. Timko, T. Dvir, D.S.Kohane // *Adv. Mater.* - 2010. - Vol. 22, № 44. - P. 4925–4943.
3. Stuart, M.A. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials / M.A. Stuart, W.T.S. Huck, J. Genzer, M. Müller, et al. // *Nat. Mater.* - 2010. - Vol. 9, № 2. - P. 101–113.
4. Gao, H. Intracellularly Biodegradable Polyelectrolyte/Silica Composite Microcapsules as Carriers for Small Molecules / H. Gao, O.A. Goriacheva, N.V. Tarakina, and G.B. Sukhorukov // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2016. - Vol. 8, № 15. - P. 9651–9661.
5. Sukhorukov, G.B., Möhwald, H. Multifunctional cargo systems for biotechnology // *Curr. Trends Biotechnol.* - 2007. - Vol. 25, № 3. - P. 93–98.
6. Park, J.H. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications / J.H. Park, L. Gu, G. von Maltzahn, E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, M.J. Sailor // *Nat. Mater.* - 2009. - Vol. 8. - P. 331-336.
7. Liu, Q. A Supramolecular Shear-Thinning Anti-Inflammatory Steroid Hydrogel / Q. Lia, C. Zhan, A. Barhoumi, W. Wang, et al. // *Adv. Mater.* - 2016. -Vol. 28, Is. 31. - P. 6680-6686.
8. Kiryukhin, M. V. Adhesion of Polyelectrolyte Multilayers: Sealing and Transfer of Microchamber Arrays / M.V. Kiryukhin, S.M. Man, A. Tonoyan, H.Y. Low, and G.B. Sukhorukov // *Langmuir.* - 2012. - Vol. 28, № 13. - P. 5678-5686.
9. Sindeeva, O.A. Polylactic Acid-Based Patterned Matrixes for Site-Specific Delivery of Neuropeptides On-Demand: Functional NGF Effects on Human Neuronal Cells / O.A. Sindeeva, O. Kopach, M.A. Kurochkin, A. Sapelkin, et al. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* - 2020. - Vol. 8. - P. 497.
10. Kopach, O. Polymer microchamber arrays for geometry-controlled drug

- release: a functional study in human cells of neuronal phenotype / O. Kopach, K. Zheng, O.A. Sindeeva, M. Gai, et al. // *Biomater. Sci.* - 2019. - Vol. 7. - P. 2358-2371.
11. Antipina, M.N. Patterned microcontainers as novel functional elements for mTAS and LOC / M.N. Antipina, M.V. Kiryukhin, K. Chong, H.Y. Low and G.B. Sukhorukov // *Lab Chip.* - 2009. - Vol. 9. - P. 1472-1475.
 12. Gai, M. Polylactic acid nano- and microchamber arrays for encapsulation of small hydrophilic molecules featuring drug release via high intensity focused ultrasound / M. Gai, J. Frueh, T. Tao, A.V. Petrov, et al. // *Nanoscale.* - 2017. - Vol. 9, № 21. - P. 7063–7070.
 13. Sindeeva, O.A. Carbon dot aggregates as an alternative to gold nanoparticles for the laser-induced opening of microchamber arrays / O.A. Sindeeva, E.S. Prikhozhenko, D.N. Bratashov, A.M. Vostrikova, et al. // *Soft Matter.* - 2018. - Vol. 14, № 44. - P. 9012–9019.
 14. Sindeeva, O.A. Effect of a Controlled Release of Epinephrine Hydrochloride from PLGA Microchamber Array: In Vivo Studies / O.A. Sindeeva, O.I. Gusliakova, O.A. Inozemtseva, A.S. Abdurashitov, E.P. Brodovskaya, et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2018. - Vol. 10, № 44. - P. 37855–37864.
 15. Antipina, M.N. Remote control over guidance and release properties of composite polyelectrolyte based capsules / M.N. Antipina, G.B. Sukhorukov // *Adv. Drug Deliver Rev.* - 2011. - Vol. 63, Is. 9. - P. 716-729.
 16. Kopach, O. Nano-engineered microcapsules boost the treatment of persistent pain / O. Kopach, K. Zheng, L. Dong, A. Sapelkin, et al. // *Drug Deliv.* - 2018. - Vol. 25, № 1. - P. 435–447.
 17. De Cock, L.J. Polymeric Multilayer Capsules in Drug Delivery / L.J. De Cock, S. De Koker, B.G. De Geest, J. Grooten, et al. // *Angew. Chemie, International Edition.* - 2010. - Vol. 49, № 39. - P. 6954–6973.
 18. Kiryukhin, M.V. A membrane film sensor with encapsulated fluorescent dyes towards express freshness monitoring of packaged food / M.V. Kiryukhin, H. H. Lau, S.H. Goh, C. The, V. Korzh, A. Sadovoy // *Talanta.* - 2018. - Vol. 182. -

- P. 187–192.
19. Gai, M. Polylactic Acid Sealed Polyelectrolyte Multilayer Microchambers for Entrapment of Salts and Small Hydrophilic Molecules Precipitates / M. Gai, J. Frueh, V.L. Kudryavtseva, A.M. Yashchenok, and G.B. Sukhorukov // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. - 2017. - Vol. 9, № 19. - P. 16536–16545.
 20. Gai, M. In-situ NIR-laser mediated bioactive substance delivery to single cell for EGFP expression based on biocompatible microchamber-arrays / M. Gai, M.A. Kurochkin, D. Li, B.N. Khlebtsov, et al. // *J. Control. Release*. - 2018. - Vol. 276. - P. 84–92.
 21. Antipina, M.N. Micropackaging via layer-by-layer assembly: microcapsules and microchamber arrays / M.N. Antipina, M.V. Kiryukhin, A.G. Skirtach, G.B. Sukhorukov // *Int. Mater. Rev.* - 2014. - Vol. 59, № 4. - P. 224–244.
 22. Kiryukhin, M.V. Fabrication and mechanical properties of microchambers made of polyelectrolyte multilayers / M.V. Kiryukhin, S. Man, S.R. Gorelik, G.S. Subramanian, H.Y. Low, G.B. Sukhorukov // *Soft Matter*. - 2011. - Vol. 7, № 14. - P. 6550–6556.
 23. Zhang, J. Microchamber arrays made of biodegradable polymers for enzymatic release of small hydrophilic cargos / J. Zhang, R. Sun, A.O. DeSouza-Edwards, J. Frueh, G.B. Sukhorukov // *Soft Matter*. - 2020. - Vol. 16, № 9. - P. 2266–2275.
 24. Kiryukhin, M.V. Individually addressable patterned multilayer microchambers for site-specific release-on-demand / M.V. Kiryukhin, S.R. Gorelik, S.M. Man, G.S. Subramanian, et al. // *Macromol. Rapid Commun.* - 2013. - Vol. 34, № 1. - P. 87–93.
 25. Li, W. Polyelectrolyte multilayer microchamber-arrays for in-situ cargo release: Low frequency vs. medical frequency range ultrasound / W. Lia, M. Gai, J. Frueha, V.L.Kudryavtseva, G.B.Sukhorukov // *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Asp.* - 2018. - Vol. 547. - P. 19–27.
 26. Huang, S. Smart Cu_{1.75}S nanocapsules with high and stable photothermal efficiency for NIR photo-triggered drug release / S. Huang, J. Liu, Q. He, H.

- Chen, J. Cui, et al. // *Nano Res.* - 2015. - Vol. 8, № 12. - P. 4038–4047.
27. Shiotani, A. Active Accumulation of Gold Nanorods in Tumor in Response to Near-Infrared Laser Irradiation / A. Shiotani, Y. Akiyama, T. Kawano, Y. Niidome, T. Mori, et al. // *ACS Bioconjug. Chem.* - 2010. - Vol. 21, № 11. - P. 2049–2054.
 28. Gai, M. Polylactic acid sealed polyelectrolyte complex microcontainers for controlled encapsulation and NIR-Laser based release of cargo / M. Gai, W. Lia, J. Frueh, G.B. Sukhorukov // *Colloids Surfaces B: Biointerfaces.* - 2019. - Vol. 173. - P. 521–528.
 29. Ermakov, A. Polyelectrolyte–Graphene Oxide Multilayer Composites for Array of Microchambers which are Mechanically Robust and Responsive to NIR Light / A. Ermakov, S.H. Lim, S. Gorelik, A.P. Kauling, R.V. Oliveira, et al. // *Macromol. Rapid Commun.* - 2019. - Vol. 40, № 5. - P. 1700868.
 30. Kiryukhin, M. V. A membrane film sensor with encapsulated fluorescent dyes towards express freshness monitoring of packaged food / M.V. Kiryukhin, H.H. Lau, S.H. Goh, C.Teh, et al. // *Talanta.* - 2018. - Vol. 182. - P. 187–192.
 31. Dekaliuk, M.O. Fluorescent carbon nanomaterials: “quantum dots” or nanoclusters? / M.O. Dekaliuk, O. Viagin, Y.V. Malyukin and A.P. Demchenko // *Phys. Chem. Chem. Phys.* - 2014. - Vol. 16, № 30.- P. 16075–16084.
 32. Sun, Y. Quantum-Sized Carbon Dots for Bright and Colorful Photoluminescence / Y. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K.A.S. Fernando, P. Pathak, et al. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006. - Vol. 128. - P. 7756–7757.
 33. Zheng, L. Electrochemiluminescence of Water-Soluble Carbon Nanocrystals Released Electrochemically from Graphite / L. Zheng, Y. Dong, J. Lin and B. Wang // *J. Am. Chem. Soc.* - 2009. - Vol. 131. - P. 4564–4565.
 34. Qi, B.P. Electrochemical Methods to Study Photoluminescent Carbon Nanodots: Preparation, Photoluminescence Mechanism and Sensing / B.P. Qi, L. Bao, Z.L. Zhang and D.W. Pang // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* - 2016. - Vol. 8, № 42. - P. 28372–28382.
 35. Prikhozhenko, E.S. Solvothermal synthesis of hydrophobic carbon dots in

- reversed micelles / E.S. Prikhozhenko, D.N. Bratashov, A.N. Mitrofanova, A.V. Sapelkin, et al. // *J. Nanoparticle Res.* - 2018. - Vol. 20, № 9. - P. 234.
36. Kokorina, A.A. Dispersion of optical and structural properties in gel column separated carbon nanoparticles / A.A.Kokorina, E.S.Prikhozhenko, N.V.Tarakina, A.V.Sapelkin, et al. // *Carbon.* - 2018. - Vol. 127. - P. 541–547.
37. Griengl, H. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases / H. Griengl, H. Schwab, M. Fechter // *Trends in Biotechnology.* - 2000. - Vol. 18, № 6. - P. 252–256.
38. Bornscheuer, U.T. Engineering the third wave of biocatalysis / U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, et al. // *Nature.* - 2012. - Vol. 485, № 7397. - P. 185–194.
39. Sukhorukov, G.B. Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes / G. B. Sukhorukov, E. Donath, S. Moya, A. S. Susha, et al. // *J. Microencapsul.* - 2000. - Vol. 17, № 2. - P. 177–185.
40. Antipov, A.A., Influence of the ionic strength on the polyelectrolyte multilayers' permeability / A.A. Antipov, G.B. Sukhorukov, H. Möhwald // *Langmuir.* - 2003. - Vol. 19, № 6. - P. 2444–2448.
41. Lvov, Y. Urease Encapsulation in Nanoorganized Microshells / Y. Lvov, A.A. Antipov, A. Mamedov, H. Möhwald, and G.B. Sukhorukov // *Nano Lett.* - 2001. - Vol. 1, № 3. - P. 125–128.
42. Zhu, H., Macromolecule encapsulation in diazoresin-based hollow polyelectrolyte microcapsules / H. Zhu, M.J. McShane // *Langmuir.* - 2005. - Vol. 21, № 1. - P. 424–430.
43. Huggins, C. Colorimetric determination of amylase / C. Huggins and P.S. Russell // *Annals of Surgery.* - 1948. - Vol. 66. - P. 164–174.
44. Cochran, B. Kinetic analysis of amylase using quantitative Benedict's and iodine starch reagents / B. Cochran, D. Lunday, F. Miskevich // *ACS J. Chem. Educ.* - 2008. - Vol. 85, № 3. - P. 401–403.
45. Pimstone, N.R. A Study of the Starch-Iodine Complex: A Modified Colorimetric Micro Determination of Amylase in Biologic Fluids / N.R.

- Pimstone // Clin. Chem. - 1964. - Vol. 10, № 10. - P. 891–906.
46. Химия и технология крахмала [Текст] / Под ред. д-ра Р. В. Керра ; Пер. с англ. М. Я. Рубинштейна ; Под ред. и с доп. проф. А. С. Сипягина и проф. Б. Н. Степаненко. - 2-е изд., испр. и доп. - Москва : Пищепромиздат, 1956. - 579 с.
47. Кирейко, А.В. Механизм реакций пероксидазного окисления о-дианизида, 3, 3', 5, 5'-тетраметилбензида и о-фенилендиамина в присутствии додецилсульфата натрия / А. В. Кирейко, И. А. Веселова Т. Н. Шеховцова // Биоорганическая химия. - 2006. - Т. 32. - №1. - С. 80-86.
48. Volpe, G. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study / G. Volpe, R. Draisci, G. Palleschi and D. Compagnone // Analyst. -1998. - Vol. 123, № 6. - P. 1303–1307.