

СОЗДАНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ НАНОСКАВЕНДЖЕРОВ ДЛЯ ДЕТОКСИФИКАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ: ВЛИЯНИЕ ТИПА НАНОЧАСТИЦ

© 2025 г. Т. Н. Паширова^{1, 2, *}, Д. А. Татарин², М. В. Габова¹, С. Н. Баташева¹,
В. Н. Курьяков³, З. М. Шайхутдинова^{1, 2}, В. Ф. Мионов², П. Массон¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, ул. Кремлевская, 18, Казань, 420008 Россия

²Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН,
ул. Акад. Арбузова, 8, Казань, 420088 Россия

³Институт проблем нефти и газа РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119333 Россия

*e-mail: tatyana_pashirova@mail.ru

Аннотация. В качестве биокаталитических наноскавенджеров для разложения фосфорорганического соединения (параоксона) могут быть использованы биосовместимые наносистемы различного типа: полимеросомы на основе амфифильных ди- и триблоксополимеров полиэтиленгликоль–полипропиленсульфида (PEG–PPS), липосомы и твердые липидные наночастицы, содержащие фермент – мутантную фосфотриэстеразу, полученную из гипертермофильных архей *Saccharolobus solfataricus* (PTE). Характеристики PTE-содержащих наносистем, полученные методом динамического рассеяния света, – размер в области 100 нм, полидисперсность, не превышающая 0.3, и отрицательный поверхностный потенциал систем – свидетельствуют о возможности их применения в детоксикационной терапии. Определение концентрации полимерных наночастиц в растворе методом ультрамикроскопии позволило рассчитать концентрацию фермента PTE внутри наночастиц, которая намного выше, чем концентрация токсиканта (параоксона). Методом диализа оценена проницаемость мембраны для продукта реакции гидролиза параоксона – *пара*-нитрофенола и фермента PTE. Исследование кинетики гидролиза параоксона, катализируемого ферментом PTE и PTE-содержащими наносистемами, методом спектрофотометрии показало, что инкапсулирование фермента и тип наночастиц не меняют механизм реакции Михаэлиса–Ментен. Установлено, что активность фермента PTE в наносистемах выше, чем у его неинкапсулированной формы, и зависит от типа наночастиц. Из серии исследованных наносистем наиболее перспективными для дальнейших испытаний и детоксикационной терапии являются полимеросомы, полученные на основе PEG–PPS.

Ключевые слова: полимеросомы, липосомы, твердые липидные наночастицы, биоскавенджер, фермент, фосфорорганические соединения

Финансирование работы. Данная работа финансировалась за счет гранта Академии наук Республики Татарстан, предоставленного молодым кандидатам наук (постдокторантам) с целью защиты докторской диссертации, выполнения научно-исследовательских работ, а также выполнения трудовых функций в научных и образовательных организациях Республики Татарстан в рамках Государственной программы Республики Татарстан «Научно-технологическое развитие Республики Татарстан».

Соблюдение этических стандартов. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Eric Chabrière, David Daudé, Pauline Jacquet и компании Gene & Green TK (Марсель, Франция) за предоставленный образец мутантной фосфотриэстеразы.

Поступила в редакцию 21.08.2025

После доработки 24.09.2025

Принята к публикации 24.09.2025

CREATION OF EFFECTIVE BIOCATALYTIC NANOSCAVENGERS FOR ORGANOPHOSPHORUS DETOXIFICATION: INFLUENCE OF NANOPARTICLE TYPE

T. N. Pashirova^{1, 2, *}, D. A. Tatarinov², M. V. Gabova¹, S. N. Batasheva¹,
V. N. Kuryakov³, Z. M. Shaihtudinova^{1, 2}, V. F. Mironov², P. Masson¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008, Russia

²Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Kazan, 420088 Russia

³Oil and Gas Research Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119333 Russia

*e-mail: tatyana_pashirova@mail.ru

Abstract. Biocompatible nanosystems of various types containing a phosphotriesterase mutant obtained from hyperthermophilic archaea *Saccharolobus solfataricus* (PTE), such as: polymersomes based on amphiphilic di- and triblock copolymers of polyethyleneglycol–polysulfide (PEG–PPS), liposomes and solid lipid nanoparticles can be used as biocatalytic nanoscatengers for hydrolytic detoxification of the organophosphorus compound paraoxon. The characteristics of PTE-loaded nanoparticles, determined by the dynamic light scattering are: diameter of about 100 nm, polydispersity not exceeding 0.3 and negative surface potential, indicate the possibility of their use in detoxification therapy. Determination of the concentration of polymer nanoparticles in solution by ultramicroscopy made it possible to calculate the concentration of the enzyme inside the nanoparticles, which is much higher than the concentration of the toxicant (paraoxon). Membrane permeability for the paraoxon hydrolysis product – *para*-nitrophenol and PTE enzyme was estimated by dialysis. The kinetic study of the paraoxon hydrolysis catalyzed by the free PTE and PTE-containing nanosystems showed that an enzyme encapsulation and a type of nanoparticles do not change the Michaelis–Menten enzyme reaction mechanism. The catalytic activity of PTE in nanosystems was found to be higher than in its non-encapsulated form and depend on the type of nanoparticles. Of the series of nanosystems studied, the most promising for further testing and detoxification therapy are polymersomes based on PEG–PPS.

Keywords: polymersomes, liposomes, solid lipid nanoparticles, bioscavenger, enzyme, organophosphorus compounds

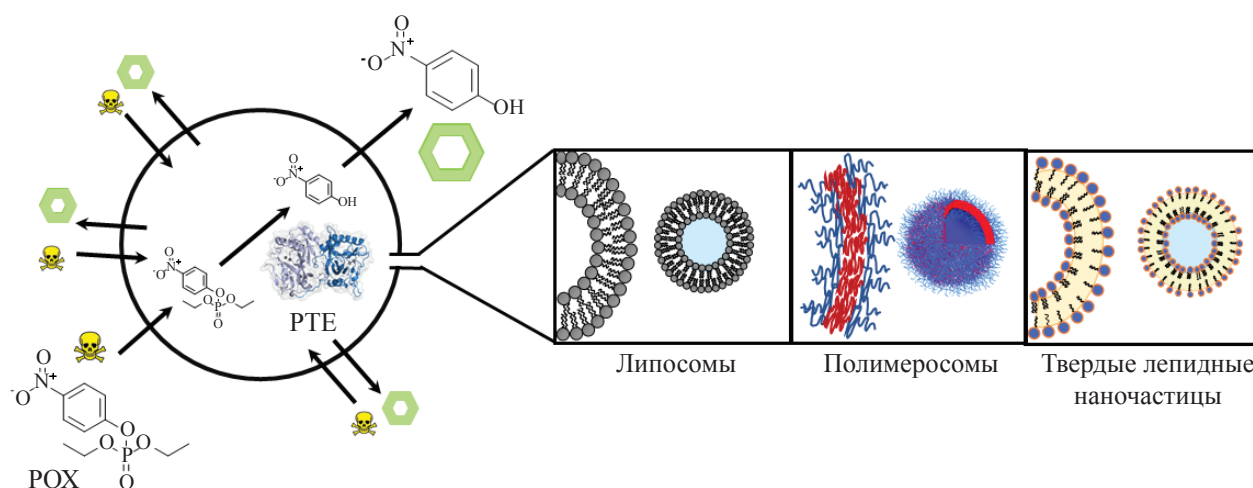
Funding. This work was supported by the grant presented by the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan to young candidates of science (postdoctoral researchers) for defense of the doctoral thesis, implementation of scientific researches, and working in the scientific and educational institutions of the Republic of Tatarstan within the framework of the State program of Tatarstan "Scientific and Technological Development of the Republic of Tatarstan".

Ethics declarations. There are no human or animal studies in this work.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments. The authors are grateful to Eric Chabrière, David Daudé, Pauline Jacquet and Gene & Green TK (Marseille, France) for providing a sample of mutant phosphotriesterase.

Received August 21, 2025
Revised September 24, 2025
Accepted September 24, 2025



ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день крайне необходимы инновационные решения и создание высокотехнологичных инструментов нового поколения для детоксификации и удаления загрязняющих и токсичных веществ как из окружающей среды, так и организма человека [1–4]. Бионаноремедиация и нанодетоксикация – это перспективные и экологически чистые стратегии для смягчения загрязнений окружающей среды пестицидами и человеческого организма эндогенными веществами. Новым перспективным подходом для решения проблемы детоксификации, удаления токсичных и загрязняющих веществ является разработка супрамолекулярных биокаталитических наносистем – наноскавенджеров. Механизм их действия представлен в обзорах [4–6]. Такие наносистемы представляют собой стабильные, биодоступные нанокompартменты или «водные капли», содержащие один или несколько ферментов (биоскавенджеров или каталитических антител) и окруженные мембраной. Последняя должна предотвращать утечку ферментов, но быть проницаемой для субстратов/токсикантов. Проникновение последних будет зависеть как от их гидрофильного-липофильного баланса, так и липофильности самой мембраны. В таких системах реакция разложения токсикантов осуществляется в их внутренней, строго ограниченной среде и объеме [5]. Необходимо отметить, что исследование биокаталитических нанокompартментов раскрывает важные фундаментальные аспекты для разработки искусственных клеток и органелл [7–9], а также создания биосенсоров [10, 11] и биороботов [12–14].

В настоящее время для создания моно- и мультикомпартментов используются различные наноструктуры, такие как фосфолипидные и полимерные везикулы, эмульсии Пикеринга, многослойные полимерные LBL-капсулы, протеиносомы, силикатные наночастицы, металлоорганические каркасы и т.д. [15,

16]. Эффективность и производительность наносистем, содержащих фермент, определяется различными факторами, такими как обеспечение изолированного пространства с высокой локальной концентрацией ферментов для снижения константы Михаэлиса (K_m) (т.е. увеличения сродства фермента к субстрату и скорости реакции k_{cat}) [17], высокая эффективность капсулирования и загрузки фермента, быстрое проникновение реагентов и продуктов реакции через мембрану наносистем, а также их стабильность и масштабируемость. Описание кинетических процессов реакций в таких системах все еще находятся в разработке [18]. Кинетические основы ферментативных реакций в нанокompартментах описаны в нашей предыдущей работе [19].

Настоящая работа направлена на разработку эффективных биокаталитических наночастиц различного типа, содержащих мутантную фосфотриэстеразу с высокой активностью по отношению к фосфорорганическому соединению – параоксону [20–22]. Инкапсулирование мутантной формы фосфотриэстеразы позволит обеспечить уклонение организма от нежелательного иммунного ответа и предотвратить быстрое выведение фермента из организма.

В работе проведено варьирование типа используемого наноматериала (липиды и амфифильные блок-сополимеры) и мониторинг проницаемости мембраны наночастиц для продукта реакции – *para*-нитрофенола, а также влияние типа наночастиц на эффективность захвата фермента и его каталитическую активность.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались амфифильные блок-сополимеры (PEG–PPS) на основе производных метилового эфира полиэтиленгликоля (mPEG, $M_n = 750$, $M_n = 2000$, Sigma-Aldrich, США) и полипропиленсульфида (PPS, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd,

Токио, Япония), структурная формула которых, представлена на Рис. 1. Методика синтеза и доказательства их структур методами спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C и ИК соединений представлены в наших работах [23–25]. Параметр гидрофильной фракции f_{PEG} рассчитывался по уравнению: $f_{\text{PEG}} = M_n(\text{PEG}) / M_n(\text{PEG}) + M_n(\text{PPS})$ [23]. Расчет соотношения PEG/PPS проведен по данным сигналов в спектре ЯМР ^1H , а именно сравнение интегральной интенсивности протонов метильной группы PPS с интегральной интенсивностью протонов метоксигруппы mPEG.

В работе использовался фермент (PTE) – мутантная фосфотриэстераза, подобная лактоназе *SsoPox-III1*, 72 кДа, полученная из гипертермофильных архей *Saccharolobus solfataricus* [20, 21, 27], предоставленный компанией Gene & Green TK (Марсель, Франция). Последней проводились все этапы получения фермента и его очистка, все детали эксперимента описаны в нашей работе [23]. Вариант *SsoPox-III1* содержит пять мутаций по сравнению с ферментом дикого типа (L72C/Y97F/Y99F/W263V/I280T) и обладает высокой термостабильностью ($T_m = 96.3^\circ\text{C}$) [23]. У использованной PTE k_{cat}/K_m на несколько порядков выше, чем у фермента дикого типа в отношении параоксона [28], и составляет $(1.14 \pm 0.50) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ при 25°C [23, 28]. Экспрессия *SsoPox-III1* проводилась в штамме *E. coli* BL21(DE3), содержащем плазмиду pGro7 (TaKaRa), с последующей очисткой фермента с использованием эксклюзионной хроматографии [27].

Полимерные везикулы – полимеросомы на основе амфифильных блок-сополимеров PEG–PPS1–4

получали с использованием метода гидратации пленки [29]. Для этого PEG–PPS растворяли в 1 мл раствора этанол: хлороформ (соотношение 1 : 1). Полученный гомогенный раствор выдерживали на водяной бане в диапазоне температур $34\text{--}37^\circ\text{C}$ до полного испарения спирта и образования пленки. Далее предварительно нагретый до 37°C 10 мМ трис-буфер (pH 7.4), содержащий фермент PTE или продукт реакции – *para*-нитро-фенол, рНр, добавляли к пленке для гидратации сополимера при температуре 37°C . Затем раствор PEG–PPS (0.5 масс. %, содержащий фермент PTE ($C = 12 \text{ мкМ}$) или рНр ($C = 0.1 \text{ масс. \%}$)) перемешивали с помощью магнитной мешалки (Ика, Германия) 750 об/мин при температуре 37°C в течение 3 ч и при температуре 25°C в течение 24 ч.

Для приготовления липосомальной системы, содержащей PTE, использовали метод гидратации липидной пленки с использованием техники экструзии [30]. Для этого L- α фосфатидилхолин (PC, Soy, 95%, Avanti polar lipids, США) растворяли в 1 мл этилового спирта. Затем раствор выдерживали на водяной бане при 60°C до полного испарения спирта. Далее добавили раствор фермента PTE в 10 мМ трис-буфере (pH 7.4) той же температуры до получения липосомального раствора с $C_{\text{PC}} = 6.25 \text{ масс. \%}$. Далее раствор перемешивали в течение 30 мин на магнитной мешалке (Ика, Германия), скорость перемешивания 700 об/мин. Затем липосомальный раствор выдерживали в течение 1.5 ч на водяной бане при 37°C . Для получения монодисперсных частиц ($C_{\text{PC}} = 6.25 \text{ масс. \%}$, $C_{\text{PTE}} = 12.5 \text{ мкМ}$), раствор подвергли экструзии

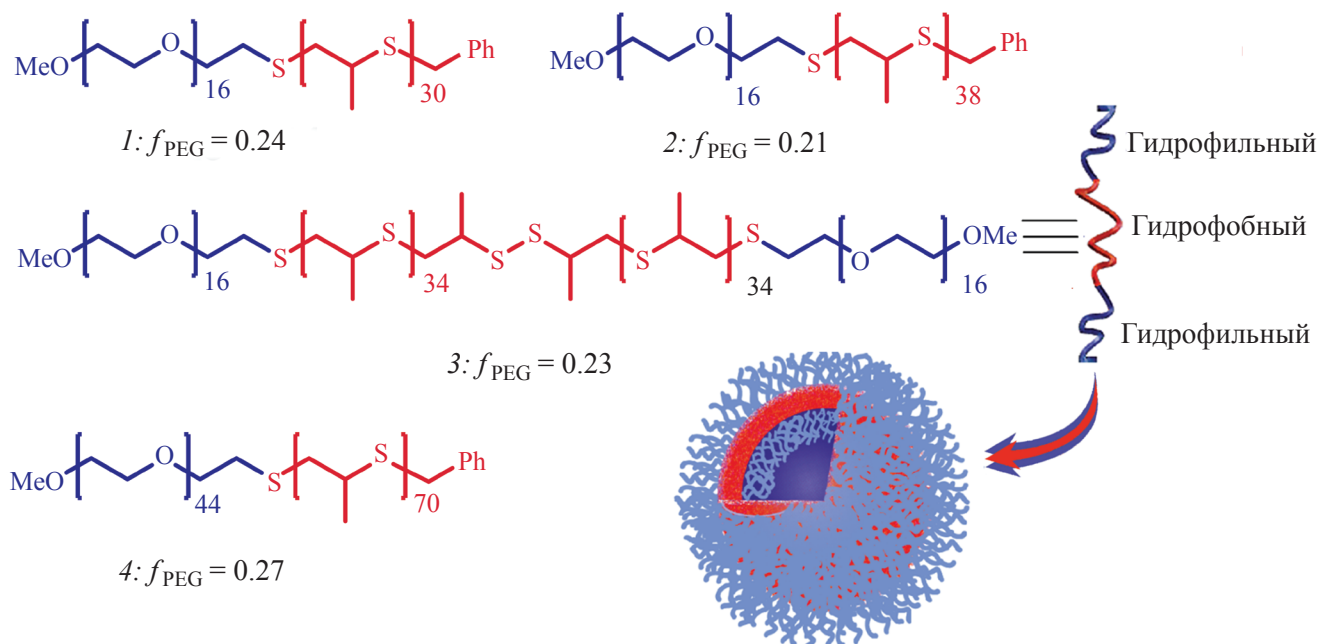


Рис. 1. Структура ди- и триблок-сополимеров PEG–PPS, на основе mPEG с $M_n = 750$ (1, 2 и 3) и $M_n = 2000$ (4).

Fig. 1. Structure of di- and triblock copolymers PEG–PPS based on mPEG with $M_n = 750$ (1, 2 and 3) and $M_n = 2000$ (4).

с помощью миниэкструдера (Avanti Polar Lipids, Inc.) 15 раз через поликарбонатную мембрану (диаметр пор 100 нм).

Для приготовления твердых липидных наночастиц (SLN), содержащих фермент, использовали метод получения двойной эмульсии (W/O/W) [31]. Для этого SLN-1, SLN-2 и SLN-3 содержали внутреннюю водную фазу с ферментом РТЕ ($C_{\text{РТЕ}} = 15$ мкМ и 30 мкМ) объемом 1, 0.5 и 1 мл соответственно в 10 мМ Трис-буфере (pH 7.4). Раствор с РТЕ был добавлен в липидный раствор, содержащий 5 мл глицерина, липида (Lipoid S75, 75% соевый РС, предоставлен компанией Lipoid GmbH, Людвигсхафен, Германия) (1 масс. %) и Dynasan 114 (глицерил тримиристат, предоставлен компанией Cremer Oleo GmbH & Co. KG (Гамбург, Германия) (1.5 масс. %), при температуре на 5–10°C выше, чем температура плавления липида, после чего провели гомогенизацию с помощью оборудования Ultra-Turrax, IKA, T18 (Германия) со скоростью перемешивания 10 000 об/мин в течение 10 мин. Полученная эмульсия (w/o) была помещена в 10 мМ трис-буфера (pH 7.4) общим объемом 40 мл, содержащего поверхностно-активное вещество (1 масс. %) [твин-80 (Sigma) для SLN-1, SLN-2 и полоксимер-188 (Sigma) для SLN-3] при перемешивании на магнитной мешалке (Ika, Германия), скорость перемешивания 700 об/мин в течение 20 мин.

Средний размер наночастиц, дзета-потенциал и индекс полидисперсности определяли методом динамического рассеяния света с использованием приборов Zetasizer Nano (Malvern Instrument, Великобритания) и Brookhaven 90 Plus (Holtville, New York, USA). Размер

(гидродинамический диаметр, нм) рассчитывали по соотношению Эйнштейна–Стокса $D = k_B T / 3\pi\eta x$, где D – коэффициент диффузии, k_B – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, η – вязкость, x – средний гидродинамический диаметр наночастиц. Все полученные образцы разбавляли в 20 раз. Коэффициент диффузии определяли в трехкратной повторности для каждого образца.

Эффективность капсулирования (EE , %) и емкости загрузки (LC , %) для наночастиц определяли ультрацентрифугированием с дальнейшей спектрофотометрической оценкой концентрации РТЕ и рNp. Раствор наночастиц, загруженных РТЕ (0.3 мл) и рNp (0.1 мл), помещали в ультрацентрифужные пробирки (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Ultracel® 100K (Millipore Merck KGaA, Дармштадт, Германия) или Nanosep centrifugal device 3K Omega (Pall Corporation, США) и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 мин на приборе Eppendorf SE (Германия) и при 10000 об/мин в течение 15 мин на центрифуге MiniSpin plus (Eppendorf AG, Германия) для разделения наночастиц от неинкапсулированного РТЕ и рNp соответственно. Концентрацию соединений определяли по УФ-поглощению с использованием спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 35 (Perkin Elmer Instruments, США): для РТЕ – при длине волны 265 нм ($\epsilon = 93333 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 10 мМ трис/НСl буфер, pH 7.4 [24]) и для рNp – при длине волны 400 нм ($\epsilon = 11554 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 10 мМ Трис/НСl буфер, pH 7.4 [21]). $EE(\%)$ и $LC(\%)$ рассчитывали с использованием следующих уравнений:

$$EE(\%) = \frac{\text{Общее количество вещества} - \text{свободное от наночастиц количество вещества}}{\text{общее количество вещества}} \times 100\%, \quad (1)$$

$$LC(\%) = \frac{\text{Общее количество вещества} - \text{свободное от наночастиц количество вещества}}{\text{общее количество инкапсулирующего материала}} \times 100\%. \quad (2)$$

Мониторинг проницаемости мембраны наночастиц проводили методом диализа путем регистрации высвобождения фермента РТЕ и продукта реакции рNp из наночастиц. Использовали диализные мешки (Biotech CE Tubing, MWCO: 100 кДа для РТЕ и MWCO 12,000 Да, Sigma-Aldrich для рNp). В диализный мешок помещали РТЕ и рNp-содержащие наночастицы (0.6 и 0.8 мл соответственно), далее оба конца мешка закрепляли зажимами и помещали в термостатирующую емкость с трис/НСl-буфером (0.01 М), pH 7.4, 37°C со скоростью перемешивания 150 об/мин. Через заданные промежутки времени отбирали образцы объемом 0.6 мл из среды и измеряли их оптическую плотность с помощью спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 35 (Perkin Elmer Instruments, США). Анализ образцов проводили в трехкратной повторности.

Концентрация наночастиц измерялась с помощью прибора NP Counter (ООО НП ВИЖН, Россия). Измерения концентрации частиц основаны

на ультрамикроскопии с использованием лазера мощностью 50 мВт, работающего на длине волны $\lambda = 650$ нм. Видеозаписи осуществлялись КМОП-камерой с частотой 50 кадров в секунду (кадр/с) и обрабатывались с помощью программного обеспечения NP Vision. Частицы наблюдались в сфокусированном лазерном луче в объеме образца длиной около 400 мкм, шириной 30 мкм и глубиной 10 мкм [32].

Активность фермента РТЕ определяли при стандартной для биохимических исследований температуре 25°C в трис/НСl-буфере ($C = 0.01$ М), pH = 7.4 с добавлением 0.2 мМ CoCl_2 . Стоковые растворы параоксона (РОХ, чистота $\geq 90\%$, Sigma-Aldrich, Канада) были приготовлены в этаноле (96 об. %). Конечная концентрация EtOH в кювете составляла 1.5 об. %. Кинетику равновесного состояния определяли путем регистрации высвобождения продукта реакции гидролиза РОХ – *пара*-нитрофенола (рNp) при длине волны, равной 400 нм в течение 180 с. Концентрация фермента в кювете

составляла 3.09 нМ для всех систем, кроме SLN ($C_{PTE} = 0.088$ нМ) и PEG–PPS-1 ($C_{PTE} = 4.54$ нМ). Расчеты каталитических параметров (K_m , мкМ – константа Михаэлиса, V_{max} , мин^{–1} – максимальная скорость реакции) для гиперболических нелинейных зависимостей проводились с учетом модели уравнения Михаэлиса–Ментен с использованием программного обеспечения Origin software (OriginLab Co, Northampton, MA, USA). Согласно кинетическим основам ферментативных реакций, протекающих в нанокompартментах, содержащих существенно превосходящую концентрацию фермента над субстратом и описанных в нашей работе [19], каталитические параметры (k'_{cat} и K'_m) отличаются от тех, что определяются в растворе (k_{cat} и K_m) из-за характеристик среды и ограничения ее объема (нанообъем, краудинг-эффект, вязкость среды). K'_m связана с K_m в растворе следующим образом: $K_m = K'_m + [PTE]$. Скорость ферментативной реакции при низкой концентрации субстрата и высокой концентрации самого фермента выражается следующим уравнением:

$$v = \frac{k'_{cat}}{K'_m + [PTE]} [PTE][POX]. \quad (3)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания наноскавенджеров были выбраны биосовместимые и представляющие потенциальный интерес для терапевтического использования наночастицы: липосомы, полимеросомы и твердые липидные наночастицы с водным ядром. На Рис. 2 схематически представлена среда, ограниченная мембраной, в которой протекает катализируемая ферментом (PTE) реакция гидролиза субстрата POX.

Скорость реакции зависит от проницаемости субстрата через мембрану наночастиц. Проницаемость

определяется как гидрофильно-липофильным балансом мембраны, так и липофильностью субстрата [33, 34]. Субстрат POX является липофильным субстратом с коэффициентом распределения октанол–вода $K_{ow} = 3.731$ [35] и растворимостью в воде не более 20 мкМ. Необходимо отметить, что при отравлении человека POX его максимальная концентрация в крови составляет не более 5 мкМ [36].

Известно, что амфифильные ди- и триблок-сополимеры на основе полиэтиленгликоля и полипропиленсульфида (PEG–PPS) перспективны для клинических испытаний [37–39]. Как правило, гидрофильный блок PEG обеспечивает устойчивость к адсорбции белка, более длительное время циркуляции в русле крови, низкую токсичность. Гидрофобный блок PPS благоприятен для получения полимеросом с улучшенной стабильностью. Известно, что амфифильные ди- и триблок-сополимеры PEG–PPS могут образовывать лиотропные ламеллярные мезофазы и полимерные везикулы, называемые полимеросомы [40]. Морфология образования агрегатов PEG–PPS определяется соотношением гидрофобной и гидрофильной части PEG–PPS или параметром f_{PEG} [41–43]. Для образования везикулярных структур f_{PEG} должно находиться в диапазоне: $0.2 < f_{PEG} < 0.3$. Используемые в работе PEG–PPS, представленные на Рис. 1, характеризуются значением f_{PEG} в указанном диапазоне, и соответственно способны образовывать полимерные везикулы в растворе. При переходе от PEG–PPS-1 к PEG–PPS-2 происходит увеличение гидрофобности, от PEG–PPS-1 к PEG–PPS-4 – гидрофильного блока. Для получения PEG–PPS-полимеросом был использован метод гидратации пленки [30]. Разработанный нами протокол получения полимерных везикул исключал такие этапы, как ультразвуковая обработка, экструзия, гомогенизация, циклы замораживания-оттаивания, а также

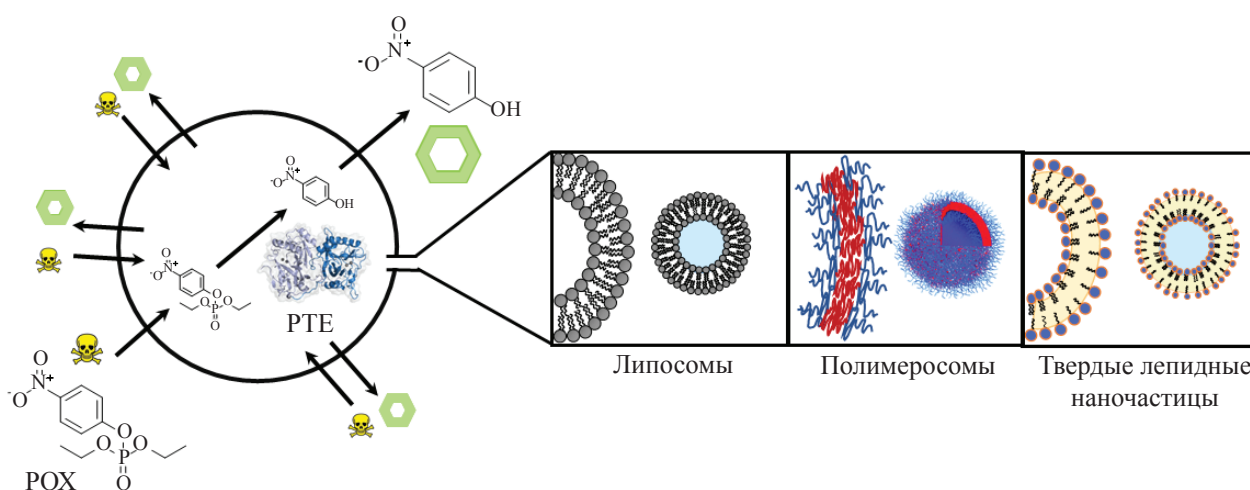


Рис. 2. Схема ферментативной реакции, проходящей внутри наночастиц: липосом, полимеросом и твердых липидных наночастиц, где POX – субстрат параоксон, PTE – фермент.

Fig. 2. Scheme of enzymatic reaction, occurring inside of nanoparticles: liposomes, polymersomes and solid lipid nanoparticles, where POX is substrate paraoxone, PTE is enzyme.

использование органических растворителей, что в дальнейшем позволило избежать изменения структуры фермента и сохранение его активности.

На первоначальном этапе был проведен анализ проницаемости мембраны полимеросом для продукта реакции – *пара*-нитрофенола (pNp). Для этого были получены полимеросомы, содержащие pNp с высокой эффективностью инкапсуляции (93–98%) и загрузки (~19%). Характеристики полученных наносистем представлены в Табл. 1. Видно, что все системы являются монодисперсными, индекс полидисперсности не превышает 0.3. Размеры увеличиваются как с ростом гидрофобности блок-сополимеров от PEG–PPS-1 к PEG–PPS-2, так и гидрофильности от PEG–PPS-1

к PEG–PPS-4. Размеры наночастиц для диблок-сополимера PEG–PPS-1 и триблок-сополимера PEG–PPS-3 достаточно близки.

Исследование проницаемости мембраны проводилось методом диализа с помощью мониторинга высвобождения pNp из полимеросом и спектрофотометрии по увеличению оптической плотности при длине волны 400 нм (Рис. 3а).

Из Рис. 3б видно, что наблюдается взрывной характер высвобождения pNp, 50% продукта высвобождается в течение 5–10 мин для всех систем. Однако дальнейшее высвобождение pNp зависит от структуры блок-сополимера. Наилучшей проницаемостью обладает наиболее гидрофильный PEG–PPS-4. Проницаемость мембраны ухудшается с увеличением

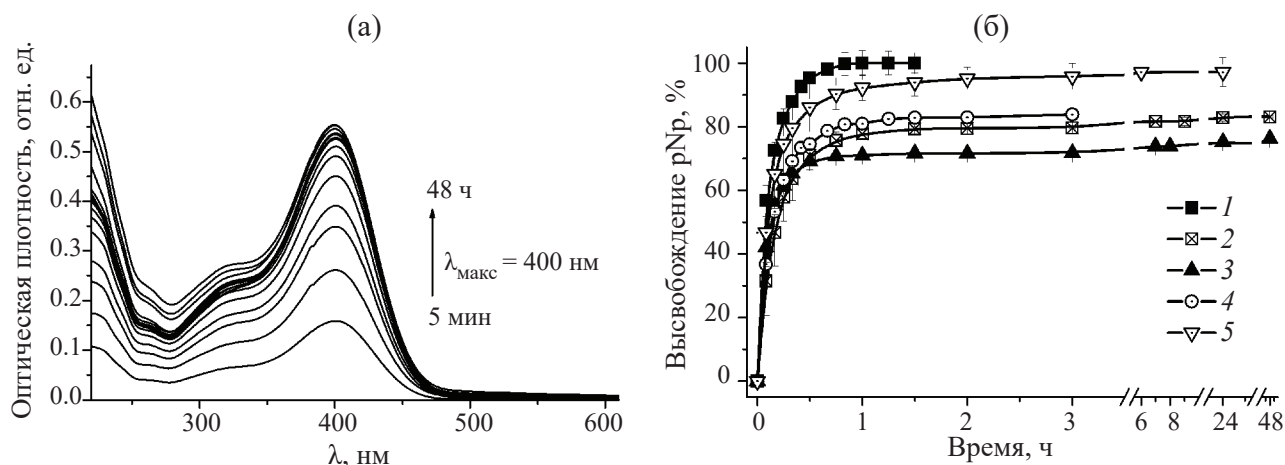


Рис. 3. Спектры поглощения pNp (а) и высвобождение pNp из PEG–PPS-полимеросом (б), где 1 – контроль (в отсутствие полимеросом), 2 – PEG–PPS-1, 3 – PEG–PPS-2, 4 – PEG–PPS-3, 5 – PEG–PPS-4, $C_{\text{PEG-PPS}} = 0.5$ масс. %, $C_{\text{pNp}} = 0.1$ масс. %, трис/HCl-буфер ($C = 0.01$ M), pH 7.4, 37°C.

Fig. 3. Absorption spectra of pNp (a) and (b) release of pNp from PEG–PPS-polymersomes: (1) control (in the absence of polymersomes) (2) PEG–PPS-1, (3) PEG–PPS-2, (4) PEG–PPS-3, (5) PEG–PPS-4, $C_{\text{PEG-PPS}} = 0.5$ wt %, $C_{\text{pNp}} = 0.1$ wt %, tris/HCl-buffer ($C = 0.01$ M), pH 7.4, 37°C.

Таблица 1. Характеристики наносистем – PEG–PPS-полимеросом, содержащих *пара*-нитрофенол (pNp), где Z_{aver} – средний диаметр наночастиц, D_{Int} – распределение размера (диаметр) наночастиц по интенсивности, PDI – полидисперсный индекс, ξ – дзета потенциал, EE и LC – эффективность инкапсулирования и загрузки, $C_{\text{PEG-PPS}} = 0.5$ масс. %, $C_{\text{pNp}} = 0.1$ масс. %, 25°C

Table 1. Characteristics of nanosystems – PEG–PPS-polymersomes containing *para*-nitrophenol (pNp), where Z_{aver} is the average diameter of nanoparticles, D_{Int} is the nanoparticle size (diameter) distribution by intensity, PDI is the polydisperse index, ξ is the zeta potential, EE and LC are the encapsulation and loading efficiency, $C_{\text{PEG-PPS}} = 0.5$ wt %, $C_{\text{pNp}} = 0.1$ wt %, 25°C

Наносистемы	Z_{aver} , нм	D_{Int} , нм	PDI	ξ , мВ	EE , %	LC , %
Полимеросомы-1	126 ± 1	122 ± 13	0.2 ± 0.01	-9 ± 1	97.7 ± 0.3	19.5 ± 0.06
Полимеросомы-2	295 ± 4	255 ± 36	0.28 ± 0.02	-11 ± 1	93.3 ± 0.6	18.7 ± 0.12
Полимеросомы-3 ^а	117 ± 1	122 ± 18	0.15 ± 0.01	-17.3 ± 1	97 ± 2	19.4 ± 0.20
Полимеросомы-4 ^б	145 ± 1	190 ± 21	0.23 ± 0.01	-5.2 ± 0.3	99.8 ± 0.1	19.8 ± 0.10

^а [20].

^б [21].

Таблица 2. Характеристики наносистем с ферментом РТЕ, 25°C**Table 2.** Characteristics of nanosystems with PTE enzyme, 25°C

Наносистема	Конц. РТЕ, мкМ	Z_{aver} , нм	D_{Int} , нм	PDI	ξ , мВ	EE, %	LC, %
Полимеросомы-1	12.5	100 ± 1	106 ± 10	0.26 ± 0.01	−14 ± 0.2	94 ± 1	16.0 ± 1.0
Полимеросомы-2	12.5	—	220 ± 36	0.46 ± 0.12	−6.0 ± 2.0	65 ± 5	11.6 ± 0.90
Полимеросомы-3	12.5	110 ± 1	106 ± 15	0.18 ± 0.01	−28 ± 2.0	96 ± 2	17.2 ± 0.40
Полимеросомы-4	12.5	92 ± 0.5	91 ± 11	0.23 ± 0.01	−7.2 ± 0.5	85 ± 4	15.1 ± 0.70
Липосомы	12.5	—	159 ± 15	0.13 ± 0.02	−6.1 ± 0.2	95 ± 1	1.3 ± 0.01
SLN-1	0.375	—	140 ± 15 621 ± 60	0.29 ± 0.01	—	62 ± 5	0.2 ± 0.02
SLN-1 ^a	0.375	273 ± 5	220 ± 15	0.40 ± 0.01	−23.4 ± 1.0	—	—
SLN-2 ^a	0.375	292 ± 3	295 ± 21	0.39 ± 0.02	−22.7 ± 1.0	13 ± 7	0.05 ± 0.01
SLN-3 ^a	0.375	—	164 ± 3 955 ± 117	0.56 ± 0.10	−29.0 ± 0.3	47 ± 7	0.17 ± 0.01

^aХранение в течение 4 месяцев.

гидрофобности блок-сополимера, для PEG–PPS-2 достигается лишь 75% высвобождения рNp в течение 48 ч. Проницаемость мембраны наночастиц мало отличается для ди- и триблок-сополимеров PEG–PPS-1 и PEG–PPS-3.

Следующий этап работы был направлен на инкапсулирование фермента РТЕ. В качестве наносистем для сравнения были выбраны экструдированные липосомы, приготовленные с использованием соевого лецитина и содержащие водное ядро — твердые липидные наночастицы на основе триглицерида, полученные методом двойной эмульсии. Характеристики полученных наносистем, содержащих РТЕ, представлены в Табл. 2. Из представленных данных видно, что размер полимеросом и липосом близки к 100 нм, полидисперсность не превышает 0.3. Для системы PEG–PPS-2 наблюдается высокая полидисперсность, скорее всего, обусловленная его гидрофобностью. Несмотря на то, что SLN обладали PDI не выше, чем 0.3 в первый день приготовления, однако с течением времени они теряли свою стабильность при хранении, что приводило к их агрегации. Полимеросомы обладали самой высокой коллоидной стабильностью. Хранение в холодильнике более 1 года не приводило к изменениям их диаметра и дзета-потенциала.

Максимальная EE (%) ~94–96% наблюдалась для полимеросом PEG–PPS-1, PEG–PPS-3 и липосом. Полученные значения выше, чем для ранее описанных инкапсулированных биомакромолекул [26], например, овальбумина — 37%, бычьего сывороточного альбумина — 19%, бычьего γ -глобулина — 15%. Однако липосомальные системы значительно уступали по эффективности загрузки (1.3%) по сравнению с полимеросомами (от 12 до 17%). Сравнение EE PEG–PPS полимеросом свидетельствует о том, что более гидрофобный PEG–PPS-2 и гидрофильный PEG–PPS-4 обладают более низкой EE — 65% и 85% соответственно, по сравнению с PEG–PPS-1. Наименьшей EE обладают SLN (от 13

до 62%). Необходимо отметить, что варьирование объема внутренней водной фазы (SLN-2) и природы ПАВ (SLN-3) значительно сказывается на EE данных систем. Таким образом, наблюдается увеличение эффективности капсулирования и загрузки фермента в ряду: SLN < липосомы ≤ полимеросомы. Полученная закономерность обусловлена прежде всего техникой получения наночастиц. SLN, подготовленные методом двойной эмульсии, содержат намного меньшую внутреннюю фазу, по сравнению с липосомальными и полимеросомными системами. Улучшение эффективности загрузки может быть увеличено в результате варьирования типа и концентрации компонентов липосомальной системы.

Далее была определена активность фермента РТЕ, загруженного в наносистемы. Для этого наночастицы были очищены от внешнего неинкапсулированного фермента методом ультрацентрифугирования. Концентрацию фермента определяли, измеряя EE. Диффузия субстрата РОХ внутрь полимеросомы происходит благодаря высокой «локальной концентрации» фермента [44] внутри наночастиц и создаваемому обратному градиенту концентрации РОХ (Рис. 2). Теоретические основы биокаталитического разложения ФОС внутри наночастиц описаны в работе [45]. Концентрация фермента РТЕ внутри наночастиц может быть определена с использованием следующего уравнения:

$$[\text{PTE}_{\text{НЧ}}] = V_{\text{общ}} [\text{PTE}_{\text{общ}}] / V_{\text{НЧ}}, \quad (4)$$

где $[\text{PTE}_{\text{общ}}]$ — количество загруженного фермента с учетом EE; $V_{\text{НЧ}}$ — объем, занимаемый наночастицами в общем объеме раствора, $V_{\text{общ}}$ — общий объем раствора. Расчет основан на ограничительных предположениях, что наночастицы являются сферическими, моносферными и мономодальными. Объем $V_{\text{НЧ}}$, занимаемый всеми наночастицами диаметром (D , нм), можно рассчитать по формуле: $V_{\text{НЧ}} = N_{\text{НЧ}} V_{\text{сферы}}$, где $N_{\text{НЧ}}$ — концентрация наночастиц. Концентрация наночастиц

была определена методом ультрамикроскопии для PEG–PPS-1, PEG–PPS-3 и PEG–PPS-4, которая составляла $(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^{13}$, $(0.9 \pm 0.2) \cdot 10^{13}$ и $(2.1 \pm 0.3) \cdot 10^{13}$ НЧ/мл соответственно. Расчет показал, что концентрация РТЕ внутри PEG–PPS-1, PEG–PPS-3 и PEG–PPS-4 полимером составляет 1.7, 1.89 и 1.22 мМ соответственно, что значительно превышает концентрацию субстрата, проникающего в наночастицы. Это условие создает обратный градиент концентрации субстрата, запуская быструю ферментативно-опосредованную нейтрализацию молекул субстрата. Кинетику реакции гидролиза РОХ контролировали методом спектрофотометрии по увеличению полосы поглощения продукта реакции рNp при 400 нм в зависимости от времени. Гидролиз РОХ, катализируемый РТЕ и инкапсулируемым РТЕ, протекает по механизму Михаэлиса–Ментен (Рис. 4).

Для всех наносистем зависимость скорости реакции от концентрации описывается гиперболическим уравнением для которых коэффициент корреляции составляет $r^2 = 0.99$, таким образом, инкапсулирование РТЕ в наночастицы не меняет механизм реакции.

Все каталитические параметры представлены в Табл. 3. Как правило, K_m и V_{max} являются внутренними характеристиками ферментов и эти параметры не должны зависеть от инкапсуляции фермента, в том случае если

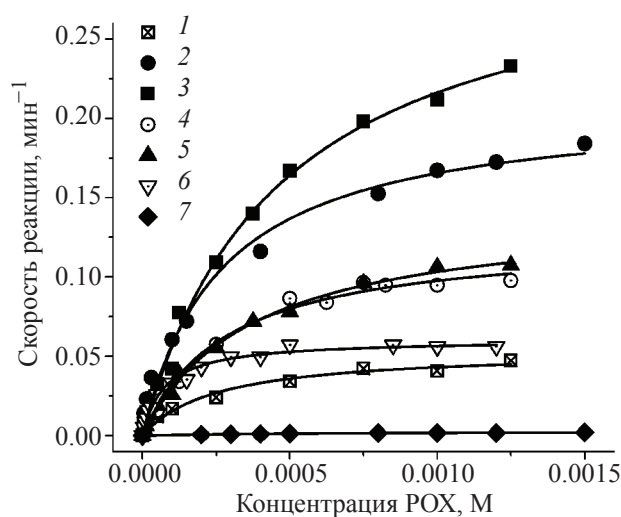


Рис. 4. Константа гидролиза субстрата РОХ катализируемого РТЕ (1) и наносистемами, содержащими РТЕ: PEG–PPS-1 (2), PEG–PPS-2 (3), PEG–PPS-3 (4), PEG–PPS-4 (5), липосомы (6) и SLN-3 (7) в зависимости от концентрации РОХ, трис/HCl буфер ($C = 0.01$ М)–этанол 1.5 об. %, содержащий CoCl_2 ($C = 0.2$ мМ), pH = 7.4, 25°C.

Fig. 4. Constants of POX hydrolysis catalyzed by PTE (1) and nanosystems, containing PTE: PEG–PPS-1 (2), PEG–PPS-2 (3), PEG–PPS-3 (4), PEG–PPS-4 (5), liposomes (6) and SLN-3 (7) in the concentration of POX, tris/HCl buffer ($C = 0.01$ M)–ethanol (1.5 vol %) containing CoCl_2 ($C = 0.2$ mM), pH = 7.4, 25°C.

диффузия субстрата/продуктов не меняется из-за возможных барьеров [46]. Анализ каталитических параметров, однако, показывает, что инкапсуляция фермента влияет на K_m и V_{max} . Так, РТЕ-липосомы обладают более высоким сродством к субстрату ($K_m = 70 \pm 5$ мкМ), что в 3 раза ниже, чем для неинкапсулированного РТЕ, и обуславливает самый высокий каталитический эффект бимолекулярной константы скорости (k_{cat}/K_m) в ряду других наносистем. Такое поведение объясняется повышенной вероятностью взаимодействия фермента с субстратом и его доступа к каталитическому центру в ограниченном реакционном пространстве, что характерно для инкапсулированных ферментов [17]. В противоположность РТЕ-липосомальным системам РТЕ–SLN обладают самой высокой константой Михаэлиса ($K_m = 607 \pm 75$ мкМ), что в 2.4 раза превышает K_m свободного фермента и свидетельствует о низком сродстве фермента к субстрату. Такое поведение обусловлено скорее всего затруднением диффузии субстрата к ферменту ввиду его плохой проницаемости через мембрану наночастицы [47], скорее всего ввиду более гидрофобной мембраны [46], что также согласуется с более гидрофобным PEG–PPS-2, для которого тоже наблюдается более высокое значение $K_m = 463 \pm 46$ мкМ, чем для неинкапсулируемого фермента. Кроме того, такие компоненты SLN, как ПАВ (твин 80, полосомер 188) способны взаимодействовать с субстратом и/или ферментом, тем самым снижая эффективность катализа или возможно изменение структуры фермента внутри наночастиц. Установлено, что все наносистемы, содержащие фермент, более эффективны (k_{cat}/K_m), по сравнению с неинкапсулируемым ферментом. Максимальное увеличение k_{cat} (в 5 раз) наблюдалось для РТЕ–PEG–PPS-2, что, скорее всего, обусловлено структурой данного блок-сополимера, который является более гидрофобным в ряду других PEG–PPS. Интересно, что увеличение скорости реакции наносистем не зависело от поверхностного потенциала и диаметра наночастиц. Для всех наносистем, за исключением липосомальных, происходит увеличение k_{cat} фермента, что объясняется увеличением скорости столкновений фермента с субстратом и со стенкой мембраны внутри наноразмерных компартментов [49, 50], что оказывает благоприятное влияние на динамику и диффузию фермента. Также это может быть связано с взаимодействием фермента с компонентами мембраны наночастиц. Так, авторы [51] показали, что значение k_{cat}/K_m было выше в случае фермента, инкапсулированного в липосомы, и было обусловлено присутствием фосфатидилглицирина в составе липидной мембраны. На данном этапе нельзя исключить модуляцию катализа мембранными компонентами, действующими как эффекторы. Кроме того, взаимодействие с мембраной может влиять на молекулярную динамику белка и, таким образом, изменять каталитические параметры. Важно отметить, что для РТЕ–SLN-3 концентрация фермента была в 33 раза ниже, чем для других систем, однако каталитический эффект (k_{cat}/K_m) остался достаточно высоким, близким к неинкапсулируемой форме фермента.

Таблица 3. Параметры реакции гидролиза РОХ катализируемой наносистемами, содержащими РТЕ в растворе трис/НСl буфер ($C = 0.01$ М)—этанол 1.5 об. %, содержащем CoCl_2 ($C = 0.2$ мМ), $C_{\text{PTE}} = 3.09$ нМ, $\text{pH} = 7.4$, 25°C

Table 3. Parameters of POX hydrolysis catalyzed by nanosystems containing PTE in a tris/HCl buffer ($C = 0.01$ M)—ethanol (1.5 vol %) solution containing CoCl_2 ($C = 0.2$ mM), $C_{\text{PTE}} = 3.09$ nM, $\text{pH} = 7.4$, 25°C

Система	V_{max} , дА/мин	k_{cat} , с^{-1}	K_m , мкМ	$k_{\text{cat}}/K_m \cdot 10^5$, $\text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$
РТЕ-полимеросомы-1 ^а	0.209 ± 0.01	67 ± 3	265 ± 44	2.5 ± 0.68
РТЕ-полимеросомы-2	0.316 ± 0.012	146 ± 6	463 ± 46	3.16 ± 1.2
РТЕ-полимеросомы-3	0.125 ± 0.005	58 ± 2	283 ± 37	2.04 ± 0.65
РТЕ-полимеросомы-4	0.142 ± 0.005	65 ± 2	372 ± 32	1.76 ± 0.69
РТЕ-липосомы	0.061 ± 0.001	28 ± 0.5	70 ± 5	4.06 ± 0.94
РТЕ-SLN-3 ^б	0.0027 ± 0.0001	45 ± 2.4	607 ± 75	0.74 ± 0.32
РТЕ	0.054 ± 0.004	29 ± 2	250 ± 54	1.16 ± 0.37

^а $C_{\text{PTE}} = 4.54$ нМ, ^б $C_{\text{PTE}} = 0.088$ нМ.

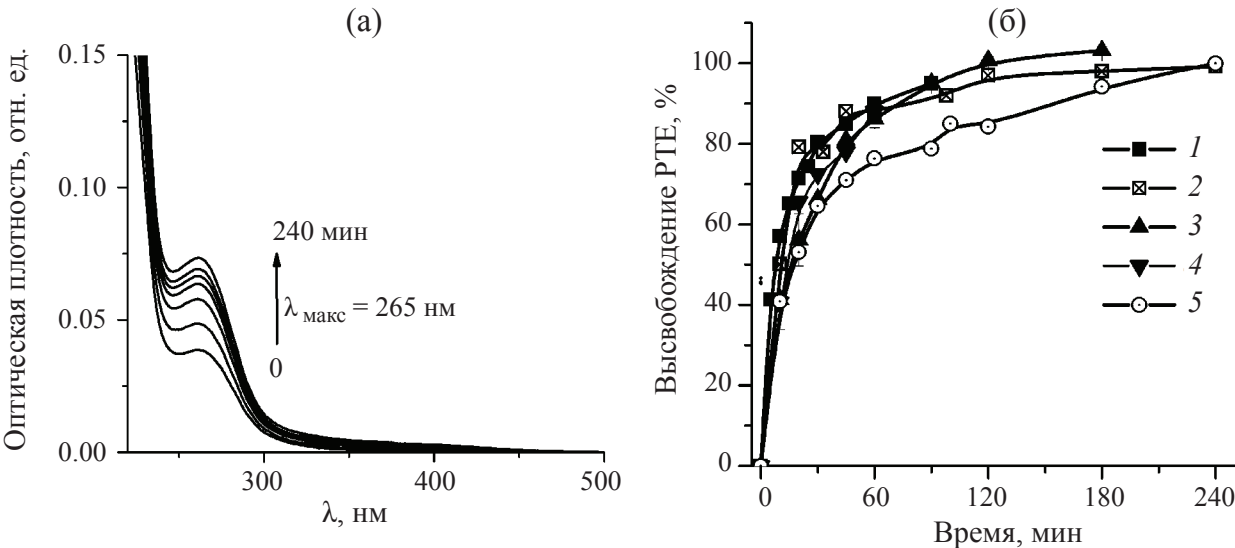


Рис. 5. Спектры поглощения РТЕ (а) и высвобождение РТЕ из PEG–PPS-полимеросом (б), где 1 – контроль (в отсутствие полимеросом), 2 – PEG–PPS-1, 3 – PEG–PPS-2, 4 – PEG–PPS-3, 5 – PEG–PPS-4, $C_{\text{PEG-PPS}} = 0.5$ масс. %, $C_{\text{PTE}} = 12.5$ мкМ, трис/НСl-буфер ($C = 0.01$ М), $\text{pH} 7.4$, 37°C .

Fig. 5. (a) Absorption spectra of PTE and (b) release of PTE from PEG–PPS polymersomes: (1) control (in the absence of polymersomes), (2) PEG–PPS-1, (3) PEG–PPS-2, (4) PEG–PPS-3, and (5) PEG–PPS-4; $C_{\text{PEG-PPS}} = 0.5$ wt %, $C_{\text{PTE}} = 12.5$ μM , tris/HCl buffer ($C = 0.01$ M), $\text{pH} 7.4$, 37°C .

Важным параметром фермент-содержащих наносистем является их стабильность. Поэтому заключительная часть работы была посвящена исследованию высвобождения фермента из наночастиц методом диализа. Мониторинг высвобождения РТЕ проводился спектрофотометрически по увеличению интенсивности полосы поглощения фермента при 265 нм (Рис. 5а).

Из Рис. 5б видно: для всех систем наблюдается быстрое высвобождение фермента. Однако необходимо отметить, что проведенный эксперимент усложнялся утечкой блок-сополимеров из диализных мешков и появлением полосы поглощения в области, близкой

к полосе поглощения фермента. В связи с этим полученные данные требуют дополнительных методов подтверждения, что планируется сделать в наших дальнейших работах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, получены биокаталитические наноскавенджеры различного типа, содержащие фермент фосфотриэстеразу, а именно полимеросомы на основе амфифильных ди- и триблок-сополимеров полиэтиленгликоль-полипропиленсульфид, липосомы

с использованием α -фосфатидилхолина и твердые липидные наночастицы с водным ядром. Установлено, что полимеросомы обладают наилучшей эффективностью инкапсулирования и загрузки фермента (94–96% и 16–17% соответственно) по сравнению с липосомами и твердыми липидными наночастицами. Полимеросомная мембрана наночастиц проницаема для продукта реакции *пара*-нитрофенола. Все наносистемы с ферментом РТЕ обладают более высокой каталитической активностью, по сравнению неинкапсулированным ферментом, поэтому перспективны для дальнейшей разработки эффективных антидотных систем. Наибольшая константа эффективности действия $k_{\text{cat}}/K_m = (4.06 \pm 0.94) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

наблюдалась у РТЕ-содержащих липосомных систем. Каждый тип наночастиц требует дополнительных исследований по определению температурных оптимумов фермента в составе наночастиц. Значительный интерес представляет варьирование типа амфифильных блок-сополимеров и применение физико-химических методов для углубленного изучения структуры полимеросомных систем, а также повышение стабильности и эффективности загрузки липосом и твердых липидных наночастиц. Последнее можно достичь с помощью методов сшивания и/или химической модификации компонентов, а также создания многослойных гибридных наноструктур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raj A., Dubey A., Malla M.A., et al. Pesticide pestilence: Global scenario and recent advances in detection and degradation methods // *Environ. Manage.* 2023. V. 338. P. 117680.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117680>
2. Fu H., Tan P., Wang R., et al. Advances in organophosphorus pesticides pollution: Current status and challenges in ecotoxicological, sustainable agriculture, and degradation strategies // *J. Hazard. Mater.* 2022. V. 424. P. 127494.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127494>
3. Choi S.K. Nanomaterial-enabled sensors and therapeutic platforms for reactive organophosphates // *Nanomaterials*. 2021. V. 11. № 1. P. 1–23.
<https://doi.org/10.3390/nano11010224>
4. Yang J., Li H., Zou H., et al. Polymer nanoantidotes // *Chem. – A Eur. J.* 2023. V. 29. № 42. P. e202301107.
<https://doi.org/10.1002/chem.202301107>
5. Kuchler A., Yoshimoto M., Luginbühl S., et al. Enzymatic reactions in confined environments // *Nature Nanotech.* 2016. V. 11. P. 409–420.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2016.54>
6. Wang Y., Zhao Q., Haag R., et al. Biocatalytic synthesis using self-assembled polymeric nano- and microreactors // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2022. V. 61. № 52. P. e202213974.
<https://doi.org/10.1002/anie.202213974>
7. Rosso A.P., de Oliveira F.A., Guégan P., et al. Evaluation of polymersome permeability as a fundamental aspect towards the development of artificial cells and nanofactories // *J. Colloid Interface Sci.* 2024. V. 671. P. 88–99.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.05.133>
8. Zong W., Shao X., Li J., et al. Synthetic intracellular environments: From basic science to applications // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. № 1. P. 535–549.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04199>
9. Jiang W., Wu Z., Gao Z., et al. Artificial cells: Past, present and future // *ACS Nano* 2022. V. 16. № 10. P. 15705–15733.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.2c06104>
10. Jiang R., Nilam M., Piselli C., et al. Vesicle-encapsulated chemosensing ensembles allow monitoring of transmembrane uptake coupled with enzymatic reactions // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2025. V. 64. № 13. P. e202425157.
<https://doi.org/10.1002/anie.202425157>
11. Pang Z., Cao Z., Li W., et al. Superwetttable interface towards biodetection in confined space // *Nano Res.* 2024. V. 17. P. 602–617.
<https://doi.org/10.1007/s12274-023-6108-x>
12. Sun Z., Hou Y. Micro/Nanorobots as active delivery systems for biomedicine: from self-propulsion to controllable navigation // *Adv. Ther.* 2022. V. 5. № 7. P. 2100228.
<https://doi.org/10.1002/adtp.202100228>

13. Li J., Esteban-Fernández de Ávila B., Gao W., et al. Micro/nanorobots for biomedicine: Delivery, surgery, sensing, and detoxification // *Sci. Robot.* 2017. V. 2. № 4. P. eaam6431.
<https://doi.org/10.1126/scirobotics.aam6431>
14. Peng Z., Iwabuchi S., Izumi K., et al. Lipid vesicle-based molecular robots // *Lab Chip.* 2024. V. 24. № 5. P. 996–1029.
<https://doi.org/10.1039/D3LC00860F>
15. Gaur D., Dubey N.C., Tripathi B.P. Biocatalytic self-assembled synthetic vesicles and coacervates: From single compartment to artificial cells // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2022. V. 299. P. 102566.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102566>
16. Sun Q., Shi J., Sun H., et al. Membrane and lumen-compartmentalized polymersomes for biocatalysis and cell mimics // *Biomacromolecules.* 2023. V. 24. № 11. P. 4587–4604.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00726>
17. Baumann P., Spulber M., Fischer O., et al. Investigation of Horseradish peroxidase kinetics in an “Organelle-like” environment // *Small.* 2017. V. 13. № 17. P. 1603943.
<https://doi.org/10.1002/sml.201603943>
18. Chauhan K., Zárate-Romero A., Sengar P., et al. Catalytic kinetics considerations and molecular tools for the design of multienzymatic cascade nanoreactors // *ChemCatChem.* 2021. V. 13. № 17. P. 3732–3748.
<https://doi.org/10.1002/cctc.202100604>
19. Shajhutdinova Z., Pashirova T., Masson P. Kinetic processes in enzymatic nanoreactors for in vivo detoxification // *Biomedicines.* 2022. V. 10. № 4. P. 784.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10040784>
20. Poirier L., Pinault L., Armstrong N., et al. Evaluation of a robust engineered enzyme towards organophosphorus insecticide bioremediation using planarians as biosensors // *Chem. Biol. Interact.* 2019. V. 306. P. 96–103.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.04.013>
21. Rémy B., Plener L., Poirier L., et al. Harnessing hyperthermostable lactonase from *Sulfolobus solfataricus* for biotechnological applications // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 37780.
<https://doi.org/10.1038/srep37780>
22. Poirier L., Brun L., Jacquet P., et al. Enzymatic degradation of organophosphorus insecticides decreases toxicity in planarians and enhances survival // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 15194.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15209-8>
23. Pashirova T., Shaihutdinova Z., Mansurova M., et al. Enzyme nanoreactor for in vivo detoxification of organophosphates // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2022. V. 14. № 17. P. 19241–19252.
<https://doi.org/10.1021/acsami.2c03210>
24. Pashirova T., Shaihutdinova Z., Tatarinov D., et al. Tuning the envelope structure of enzyme nanoreactors for in vivo detoxification of organophosphates // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. № 21. P. 15756.
<https://doi.org/10.3390/ijms242115756>
25. Pashirova T., Shaihutdinova Z., Tatarinov D., et al. Pharmacokinetics and fate of free and encapsulated IRD800CW-labelled human BChE intravenously administered in mice // *Int. J. Biol. Macromol.* 2024. V. 282. P. 137305.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.137305>
26. O’Neil C.P., Suzuki T., Demurtas D., et al. A novel method for the encapsulation of biomolecules into polymersomes via direct hydration // *Langmuir.* 2009. V. 25. № 16. P. 9025–9029.
<https://doi.org/10.1021/la900779t>
27. Jacquet P., Hiblot J., Daudé D., et al. Rational engineering of a native hyperthermostable lactonase into a broad spectrum phosphotriesterase // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 16745.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-16841-0>
28. Jacquet P., Billot R., Shimon A., et al. Changes in active site loop conformation relate to the transition toward a novel enzymatic activity // *JACS Au.* 2024. V. 4. № 5. P. 1941–1953.
<https://doi.org/10.1021/jacsau.4c00179>
29. Kumar M., Grzelakowski M., Zilles J., et al. Highly permeable polymeric membranes based on the incorporation of the functional water channel protein Aquaporin Z // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. V. 104. № 52. P. 20719–20724.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0708762104>
30. Pashirova T.N., Zueva I. V., Petrov K.A., et al. Mixed cationic liposomes for brain delivery of drugs by the intranasal route: The acetylcholinesterase reactivator 2-PAM as encapsulated drug model // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2018. V. 171. P. 358–367.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.049>

31. *Fangueiro J.F., Andreani T., Fernandes L., et al.* Physicochemical characterization of epigallocatechin gallate lipid nanoparticles (EGCG-LNs) for ocular instillation // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014. V. 123. P. 452–460. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.042>
32. *Popov K., Vainer Y., Silaev G., et al.* Potential nano/microcenters of crystal nucleation in reagent-grade purity solvents and their differentiation by fluorescent-tagged antiscalant // *Crystals*. 2024. V. 14. № 7. P. 650. <https://doi.org/10.3390/cryst14070650>
33. *Maffei V., Skowicki M., Wolf K.M.P., et al.* Advancing the design of artificial nano-organelles for targeted cellular detoxification of reactive oxygen species // *Nano Lett.* 2024. V. 24. № 9. P. 2698–2704. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.3c03888>
34. *Itel F., Chami M., Najer A., et al.* Molecular organization and dynamics in polymersome membranes: a lateral diffusion study // *Macromolecules*. 2014. V. 47. № 21. P. 7588–7596. <https://doi.org/10.1021/ma5015403>
35. *Knaak J. B., Dary C. C., Power F.* Physicochemical and biological data for the development of predictive organophosphorus pesticide QSARs and PBPK/PD models for human risk assessment // *Crit. Rev. Toxicol.* 2004. V. 34. № 2. P. 143–207. <https://doi.org/10.1080/10408440490432250>
36. *Eyer F., Eyer P.* Enzyme-based assay for quantification of paraoxon in blood of parathion poisoned patients // *Hum Exp Toxicol.* 1998. V. 17. № 12. P. 645–651. <https://doi.org/10.1177/096032719801701201>
37. *Allen S.D., Liu Y.-G., Bobbala S., et al.* Polymersomes scalably fabricated via flash nanoprecipitation are non-toxic in non-human primates and associate with leukocytes in the spleen and kidney following intravenous administration // *Nano Res.* 2018. V. 11. P. 5689–5703. <https://doi.org/10.1007/s12274-018-2069-x>
38. *Zhu S., Li S., Escuin-Ordinas H., et al.* Accelerated wound healing by injectable star poly(ethylene glycol)-*b*-poly(propylene sulfide) scaffolds loaded with poorly water-soluble drugs // *J. Control. Release*. 2018. V. 282. P. 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.006>
39. *Velluto D., Bojadzic D., De Toni T., et al.* Drug-Integrating Amphiphilic Nanomaterial Assemblies: 1. Spatiotemporal control of cyclosporine delivery and activity using nanomicelles and nanofibrils // *J. Control. Release*. 2021. V. 329. P. 955–970. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.026>
40. *Discher D.E., Eisenberg A.* Polymer vesicles // *Science*. 2002. V. 297. № 5583. P. 967–973. <https://doi.org/10.1126/science.1074972>
41. *Cerritelli S., Velluto D., Hubbell J.A., et al.* PEG-SS-PPS: Reduction-sensitive disulfide block copolymer vesicles for intracellular drug delivery // *Biomacromolecules*. 2007. V. 8. № 6. P. 1966–1972. <https://doi.org/10.1021/bm070085x>
42. *Velluto D., Demurtas D., Hubbell J.A.* PEG-*b*-PPS diblock copolymer aggregates for hydrophobic drug solubilization and release: cyclosporin A as an example // *Mol. Pharm.* 2008. V. 5. № 4. P. 632–642. <https://doi.org/10.1021/mp7001297>
43. *Scott E.A., Stano A., Gillard M., et al.* Dendritic cell activation and T cell priming with adjuvant- and antigen-loaded oxidation-sensitive polymersomes // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 26. P. 6211–6219. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.060>
44. *Luisi P.L., Souza T.P. de, Stano P.* Vesicle behavior: in search of explanations // *J. Phys. Chem. B*. 2008. V. 112. № 46. P. 14655–14664. <https://doi.org/10.1021/jp8028598>
45. *Pashirova T.N., Bogdanov A.V., Masson P.* Therapeutic nanoreactors for detoxification of xenobiotics: Concepts, challenges and biotechnological trends with special emphasis to organophosphate bioscavenging // *Chem. Biol. Interact.* 2021. V. 346. P. 109577. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109577>
46. *Belluati A., Craciun I., Liu J., et al.* Nanoscale enzymatic compartments in tandem support cascade reactions in vitro // *Biomacromolecules*. 2018. V. 19. № 10. P. 4023–4033. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01019>

47. *Varlas S., Foster J.C., Georgiou P.G., et al.* Tuning the membrane permeability of polymersome nanoreactors developed by aqueous emulsion polymerization-induced self-assembly // *Nanoscale*. 2019. V. 11. № 26. P. 12643–12654. <https://doi.org/10.1039/C9NR02507C>
48. *Balasubramanian V., Correia A., Zhang H., et al.* Biomimetic engineering using cancer cell membranes for designing compartmentalized nanoreactors with organelle-like functions // *Adv. Mater.* 2017. V. 29. № 11. P. 1605375. <https://doi.org/10.1002/adma.201605375>
49. *Chen Q., Schönherr H., Vancso G.J.* Block-copolymer vesicles as nanoreactors for enzymatic reactions // *Small*. 2009. V. 5. № 12. P. 1436–1444. <https://doi.org/10.1002/sml.200801455>
50. *Chen Q., Rausch K.G., Schönherr H., et al.* α -Chymotrypsin-catalyzed reaction confined in block-copolymer vesicles // *ChemPhysChem*. 2010. V. 11. № 16. P. 3534–3540. <https://doi.org/10.1002/cphc.201000429>
51. *Sunami T., Hosoda K., Suzuki H., et al.* Cellular compartment model for exploring the effect of the lipidic membrane on the kinetics of encapsulated biochemical reactions // *Langmuir*. 2010. V. 26. № 11. P. 8544–8551. <https://doi.org/10.1021/la904569m>