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

© 2025 г. Т. Н. Паширова^{1, 2, *}, Д. А. Татаринов², М. В. Габова¹, С. Н. Баташева¹, В. Н. Курьяков³, З. М. Шайхутдинова^{1, 2}, В. Ф. Миронов², П. Массон¹

Поступила в редакцию 21.08.2025 г. После доработки 24.09.2025 г. Принята к публикации 24.09.2025 г.

В биокаталитических наноскавенджеров качестве разложения ДЛЯ фосфорорганического соединения (параоксона) могут быть использованы биосовместимые наносистемы различного типа: полимеросомы на основе амфифильных и триблоксополимеров полиэтиленгликоль-полипропиленсульфида (PEG-PPS), липосомы и твердые липидные наночастицы, содержащие фермент – мутантную фосфотриэстеразу, полученную из гипертермофильных архей Saccharolobus solfataricus (PTE). Характеристики РТЕ-содержащих наносистем, полученные метолом 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 РТЕ внутри наночастиц, которая намного выше, чем концентрация токсиканта (параоксона). Методом диализа оценена проницаемость мембраны для продукта реакции гидролиза параоксона – пара-нитрофенола и фермента РТЕ. Исследование кинетики гидролиза параоксона, катализируемого ферментом РТЕ и РТЕ-содержащими наносистемами, методом спектрофотометрии инкапсулирование фермента и тип наночастиц не меняют механизм реакции Михаэлиса-Ментен. Установлено, что активность фермента РТЕ в наносистемах выше, чем у его

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

² Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН, ул. Акад. Арбузова, 8, Казань, 420088, Россия ³ Институт проблем нефти и газа РАН, ул. Губкина, 3, Москва, 119333, Россия *e-mail: tatyana pashirova@mail.ru

неинакпсулированной 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

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

© 2025 г. Т. N. Pashirova, D. A. Tatarinov, M. V. Gabova, S. N. Batasheva, V. N. Kuryakov, Z. M. Shaihutdinova, V. F. Mironov, P. Masson

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 polyethyleneglycolpolysulfide, liposomes and solid lipid nanoparticles can be used as biocatalytic nanoscavengers 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

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 нанокомпартменты 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 объёме [5]. Необходимо отметить, что исследование биокаталитических нанокомпартментов 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 мульти-компартментов используются различные наноструктуры, такие как фосфолипидные и полимерные везикулы, эмульсии Пикеринга, многослойные полимерные LBL-капсулы, протеиносомы, силикатные наночастицы, металлорганические 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 ($K_{\rm m}$) (т. е. увеличения сродства фермента к субстрату и скорости реакции $k_{\rm cat}$) [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 нанокомпартментах 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 — *пара*-нитрофенола, а также влияние типа наночастиц на эффективность захвата фермента и его каталитическую активность.

ЭСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовались амфифильные блок-сополимеры (mPEG–PPS) на основе производных монометилового эфира полиэтиленгликоля (mPEG, Mn = 750, Mn = 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 ¹Н и ¹³С и ИКС соединений

представлена в наших работах [23–25]. Параметр гидрофильной фракции f_{PEG} рассчитывался по уравнению: $f_{PEG} = Mn(PEG)/Mn(PEG) + Mn(PPS)$ [23]. Расчет соотношения PEG/PPS проведен по данным сигналов в спектре ЯМР 1 Н, а именно сравнение интегральной интенсивности протонов метильной группы PPS с интегральной интенсивностью протонов метоксигруппы mPEG.

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

В работе использовался фермент (РТЕ) — мутантная фосфотриэстераза, подобная лактоназе SsoPox-IIIC1, 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-IIIC1 содержит пять мутаций по сравнению с ферментом дикого типа (L72C/Y97F/Y99F/W263V/I280T) и обладает высокой термостабильностью (Tm = 96.3°C) [23]. У использованной РТЕ k_{cat}/K_m на несколько порядков выше, чем у фермента дикого типа в отношении параоксона [28] и составляет (1.14 ± 0.50) × 10^5 [23, 28]. Экспрессия SsoPox-IIIC1 проводилась в штамме E. coli BL21(DE3), содержащем плазмиду pGro7 (ТаКаRa), с последующей очисткой фермента с использованием эксклюзионной хроматографии [27].

Полимерные везикулы – полимеросомы на основе амфифильных блоксополимеров PEG–PPS 1-4 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 34–37°C до полного испарения спирта и образования пленки. Далее предварительно нагретый до 37°C

10 мМ трис-буфер (рН 7.4), содержащий фермент РТЕ или продукт реакции — napaнитрофенол, pNp, добавляли к пленке для гидратации сополимера при температуре 37 °C.

Затем раствор PEG-PPS (0.5% масс., содержащий фермент РТЕ (C = 12 мкМ) или pNp (C = 0.1% масс.) перемешивали с помощью магнитной мешалки (Іка, 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 РТЕ, 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 РТЕ в 10 мМ трис-буфере (рН 7.4) той же температуры до получения липосомального раствора с C_{PC} = 6.25% (масс.). Далее раствор перемешивали в течение 30 минут на магнитной мешалке (Іка, Германия), скорость перемешивания 700 об/мин. Затем липосомальный раствор выдерживали в течение 1.5 часов на водяной бане при 37°C. Для получения монодисперсных частиц (C_{PC} = 6.25% масс., C_{PTE} = 12.5 мкМ), раствор подвергли экструзии 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 ($C_{PTE} = 15$ мкМ и 30 мкМ) объемом 1, 0.5 и 1 мл соответственно в 10 мМ Трис-буфере (рН 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. КG (Гамбург, Германия) (1.5% масс.) при температуре на 5–10°С выше, чем температура плавления липида, после чего провели гомогенизацию с помощью оборудования Ultra-

Титтах, IKA, Т18 (Германия) со скоростью перемешивания 10 000 об/мин в течении 10 минут. 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 полоксомер-188 (Sigma) для SLN-3] при перемешивании на магнитной мешалке (Ika, Германия), скорость перемешивания 700 об/мин в течении 20 минут.

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 (Holtsville, New York, USA). Размер (гидродинамический диаметр, нм) рассчитывали по соотношению Эйнштейна–Стокса $D = k_{\rm B}T / 3\pi\eta x$, где D – коэффициент диффузии, $k_{\rm B}$ – 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 ультрацентрифугированием наночастиц определяли дальнейшей спектрофотометрической оценкой концентрации РТЕ и рNp. Раствор наночастиц, загруженных РТЕ (0.3 мл) и pNp (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 минут на центрифуге MiniSpin plus (Eppendorf AG, Германия) для разделения наночастиц от неинкапсулированного РТЕ и р Np 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 (ε = 93333 M $^{-1}$ см $^{-1}$, 10 мМ трис/HCl буфер, рН 7.4 [21]) и для рNр – при длине волны 400 нм (ε = 11554 M $^{-1}$ см $^{-1}$, 10 мМ Трис/HCl буфер, рН 7.4 [21]). *EE*, % и *LC*, % рассчитывали с использованием следующих уравнений:

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

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

Мониторинг проницаемости мембраны наночастиц проводили методом диализа путем регистрации высвобождения фермента РТЕ и продукта реакции рNр из наночастиц. Использовали диализные мешки (Biotech CE Tubing, MWCO: 100 кДа для РТЕ и МWCO 12,000 Da, Sigma-Aldrich для рNр) В диализный мешок помещали РТЕ и рNр-содержащие наночастицы (0.6 и 0.8 мл соответственно), далее оба конца мешка закрепляли зажимами и помещали в термостатирующую емкость с трис/HCl-буфером (0.01 М), рН 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 объёме 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/HCl-буфере (C=0.01 M), pH = 7.4 с добавлением 0.2 мМ CoCl₂. Стоковые растворы параоксона (POX, чистота ≥ 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 сек. Концентрация фермента в кювете составляла 3.09 нМ для всех систем, кроме SLN ($C_{\text{PTE}} = 0.088$ нМ) и PEG-PPS-1 ($C_{\text{PTE}} = 4.54$ нМ). Расчёты каталитических параметров ($K_{\rm m}$, мкМ – константа Михаэлиса, $V_{\rm max}$, 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 нанокомпартментах, 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 её объема (нанообъем, краудинг-эффект, вязкость среды). $K'_{\rm m}$ связана с $K_{\rm m}$ в растворе следующим образом: $K_{\rm m}$ = $K'_{\rm m}$ +[PTE]. Скорость ферментативной реакции при низкой концентрации субстрата и высокой концентрации самого фермента выражается следующим уравнением:

$$v = \frac{k'_{\text{cat}}}{K'_{\text{m}} + [\text{PTE}]} [\text{PTE}] [\text{POX}]. \tag{3}$$

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 (РТЕ) реакция гидролиза субстрата РОХ.

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

Скорость реакции зависит от проницаемости субстрата через мембрану наночастиц. Проницаемость определяется гидрофильно-липофильным балансом мембраны, так и липофильностью субстрата [33, 34]. Субстрат РОХ 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 РОХ 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 [37–38]. 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. Использованные 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 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 спектрофотомерии по увеличению оптической плотности при длине волны 400 нм (Рис. 3a).

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

Наносистемы	Z_{aver} (HM)	DInt, 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 ⁶	145 ± 1	190 ± 21	0.23 ± 0.01	-5.2 ± 0.3	99.8 ± 0.1	19.8 ± 0.10

a [20]

Рис. 3. Спектры поглощения pNp (a) и высвобождение pNp из PEG–PPS-полимеросом (б), где I – 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_{pNp} = 0.1% (масс.), трис/HCl-буфер (C = 0.01 M), pH 7.4, 37°C.

Из Рис. 3б видно, что наблюдается взрывной характер высвобождения pNp, 50% продукта высвобождается в течение 5–10 минут 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 гидрофобности блоксополимера, для PEG–PPS-2 достигается лишь 75% высвобождения pNp в течение 48 часов. Проницаемость мембраны наночастиц мало отличается для ди- и триблоксополимеров 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 лицитина и содержащие водное ядро – твердые липидные наночастицы на основе триглицирида, полученные методом двойной эмульсии. Характеристики полученных наносистем, содержащих РТЕ, представлены в Табл. 2. Из представленых данных видно, что размер полимеросом и липосом близки к 100 нм, полидисперсность не превышает 0.3. Для системы РЕG–РРS-2 наблюдается высокая полидисперсность, скорее всего, обусловленная его гидрофобностью. Несмотря

⁶[21]

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 агломерации. Полимеросомы обладали самой высокой коллоидной стабильностью. Хранение в холодильнике более 1 года не приводило к изменениям их диаметра и дзетапотенциала.

Таблица 2. Характеристики наносистем с ферментом РТЕ, 25°C

Наносистема	Конц. РТЕ, мкМ	Z _{aver} (HM)	$D_{ m Int},$ HM	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-2ª	0.375	292 ± 3	295 ± 21	0.39 ± 0.02	-22.7 ± 1.0	13 ± 7	0.05 ± 0.01
SLN-3ª	0.375	-	164 ± 3 955 ± 117	0.56 ± 0.10	-29.0 ± 0.3	47 ± 7	0.17 ± 0.01

^аХранение в течении 4 месяцев

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 —ы 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 \le 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 во 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:

$$[PTE_{HY}] = V_{OGHI} \lceil PTE_{OGHI} \rceil / V_{HY},$$

где [РТЕ $_{\text{общ}}$] — 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, монодисперсными 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 ± $0.2)*10^{13}, (0.9\pm0.2)*10^{13}$ и $(2.1\pm0.3)*10^{13}$ нч/мл соответственно. Расчет показал, что концентрация РТЕ внутри PEG-PPS-1, PEG-PPS3- и PEG-PPS-4 полимеросом 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 POX контролировали методом спектрофотометрии по увеличению полосы поглощения продукта реакции рNр при 400 нм в зависимости от времени. Гидролиз РОХ, катализируемый РТЕ и инкапсулируемым РТЕ протекает по механизму Михаэлиса-Ментен (Рис. 3).

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 CoCl₂ (*C* = 0.2 мМ), pH = 7.4, 25°C.

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, $K_{\rm m}$, и $V_{\rm max}$ являются внутренними характеристиками ферментов и эти параметры не должны зависеть от инкапсуляции фермента, в том случае если диффузия субстрата/продуктов не меняется из-за возможных барьеров [46]. Анализ каталитических параметров, однако, показывает, что инкапсуляция фермента влияет на $K_{\rm m}$, и $V_{\rm max}$. Так РТЕ-липосомы обладают наиболее высоким сродством к субстрату ($K_{\rm m}=70\pm5\,$ 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 РТЕлипосомальным системам PTE-SLN обладают самой высокой константой Михаэлиса (K_m $=607\pm75$ мкМ), что в 2.4 раза превышает $K_{\rm m}$ свободного фермента и свидетельствует о низком сродстве фермента к субстрату. Такое поведение обусловлено скорее всего затруднением диффузии субстрата к ферменту в виду 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 также наблюдается более высокое значение $K_{\rm m} = 463 \pm 46$ мкM, чем для неинкапсулиремого фермента. Кроме того, такие компоненты SLN, как ПАВ (твин 80, полоксомер 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 $k_{\rm cat}$ (в 5 раз) наблюдалось для PTE-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 $k_{\rm cat}$ 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 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ было выше в случае фермента, обусловлено инкапсулированного липосомы, было присутствием И 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 PTE-SLN-3 концентрация фермента была в 33 раза ниже, чем для других систем, однако каталитический эффект $(k_{\rm cat}/K_{\rm m})$ оставался достаточно высоким, близким неинкапсулируемой форме фермента.

Таблица 3. Параметры реакции гидролиза РОХ катализируемой наносистемами, содержащими РТЕ в растворе трис/HCl буфер ($C=0.01~\mathrm{M}$)-этанол 1.5% (об.), содержащем CoCl₂ ($C=0.2~\mathrm{mM}$), $C_{\mathrm{PTE}}=3.09~\mathrm{hM}$, pH = 7.4, 25°C.

Система	$V_{ m max}$,	k _{cat,}	K _m ,	$k_{\rm cat}/K_{\rm m}, \times 10^5,$
	dA/мин	сек ⁻¹	мкМ	M ⁻¹ сек ⁻¹
РТЕ-полимеросомы-1 ^a	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
PTE-SLN-3 ^b	0.0027 ± 0.0001	45 ± 2.4	607 ± 75	0.74 ± 0.32
PTE	0.054 ± 0.004	29 ± 2	250 ± 54	1.16 ± 0.37

 $^{a}C_{PTE} = 4.54 \text{ HM}, \, ^{6}C_{PTE} = 0.088 \text{ HM}$

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. 5a).

Рис. 5. Спектры поглощения РТЕ (а) и высвобождение РТЕ из PEG-PPS-полимеросом (б), где I – 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_{PTE} = 12.5 мкМ, трис/HCl-буфер (C = 0.01 M), pH 7.4, 37°C.

Из Рис. 56 видно, для всех систем наблюдается быстрое высвобождение фермента. Однако необходимо отметить, что проведенный эксперимент усложнялся утечкой блоксополимеров 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 полиэтиенгликоль-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 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ = $(4.06 \pm 0.94)10^5 \, \text{M}^{-1} \text{cek}^{-1}$ 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.

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 ТК (Марсель, Франция) за предоставленный образец мутантной фосфотриэстеразы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Raj A., Dubey A., Malla M.A. et al.* Pesticide pestilence: Global scenario and recent advances in detection and degradation methods // Jnviron. 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. Küchler 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 nanoand 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.* Superwettable 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/smll.201603943

18. Chauhan K., Zárate-Romero A., Sengar P. et al., et al. Catalytic kinetics considerations and molecular tools for the design of multienzymatic caascade 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. *Maffeis 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: alateral 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 drugsolubilization 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: insearch 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. 1436–144.

https://doi.org/10.1002/smll.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

ПОДПИСИ К РИСУНКАМ

- **Рис. 1.** Структура ди- и триблок-сополимеров PEG-PPS, на основе mPEG с Mn = 750 (1, 2 и 3) и Mn = 2000 (4).
- **Рис. 2.** Схема ферментативной реакции, проходящей внутри наночастиц: липосом, полимеросом и твердых липидных наночастиц, где POX субстрат параоксон, PTE фермент.
- **Рис. 3.** Спектры поглощения pNp (a) и высвобождение pNp из PEG–PPS-полимеросом (б), где I 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.
- **Рис. 4.** Константа гидролиза субстрата РОХ катализируемого РТЕ (l) 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 CoCl₂ (C = 0.2 мМ), pH = 7.4, 25°C.
- **Рис. 5.** Спектры поглощения РТЕ (a) и высвобождение РТЕ из PEG–PPS-полимеросом (б), где I 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_{PTE} = 12.5 мкМ, трис/HCl-буфер (C = 0.01 M), pH 7.4, 37°C.

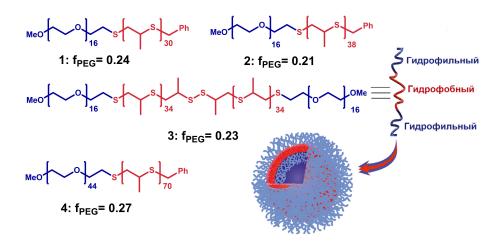


Рисунок 1. Паширова и др.

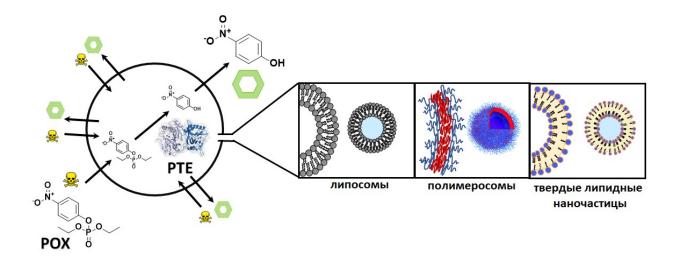


Рисунок 2. Паширова и др.

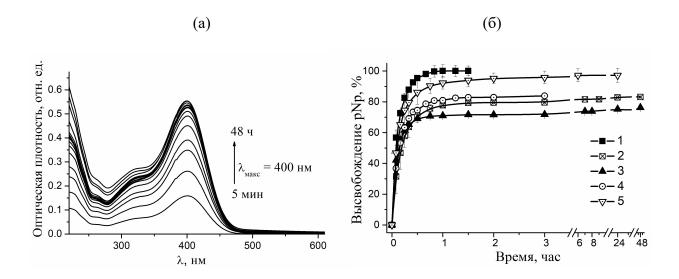


Рисунок 3. Паширова и др.

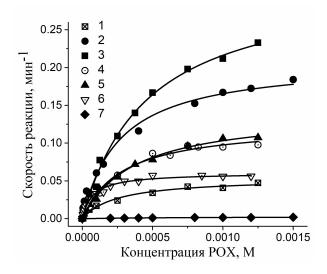


Рисунок 4. Паширова и др.

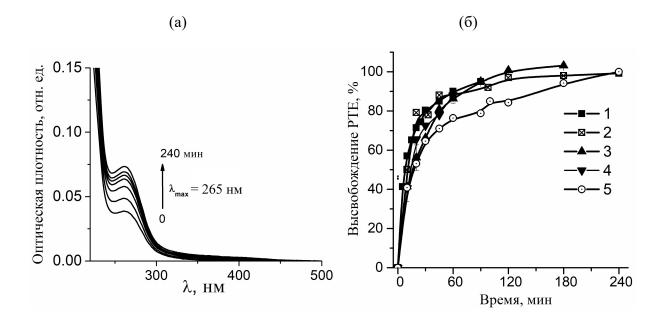


Рисунок 5. Паширова и др.