

ЗАПИТ

на проведення наукової (науково-технічної) роботи

1. Назва роботи

Нанозими: синтез, характеристика та створення на їх основі нових нанокомпозитних матеріалів із каталітичною активністю для медицини

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проекту

Цільова програма фундаментальних досліджень НАН України «Перспективні фундаментальні дослідження та інноваційні розробки наноматеріалів і нанотехнологій для потреб промисловості, охорони здоров'я та сільського господарства» на 2020–2024 рр.

4. Назва розділу програми або напряму цільового проекту

Розділ 4. Нанобіотехнології та наноматеріали медичного та сільськогосподарського призначення

4.1. Створення сучасних нанобіотехнологій і наноматеріалів медичного та аграрного призначення

5. Строки виконання роботи

01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2024 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 *(фундаментальні дослідження)*

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

8. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

9. Код та назва наукового напряму (проблеми) з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і

гуманітарних наук**2.2.5.2. Розроблення нових біотехнологічних процесів на основі мікроорганізмів****10. Науковий керівник роботи**

Гончар Михайло Васильович, д.б.н., проф., завідувач відділу, Інститут біології клітини НАН України
 телефон: +38 032 261 4144; факс: +38 032 261 2148; e-mail: gonchar@cellbiol.lviv.ua

11. Відповідальні виконавці

Прізвище, ім'я та по батькові	Науковий ступінь, посада, місце роботи, телефон, електронна адреса	Підпис
Гайда Галина Зуфарівна	к.х.н., с.н.с., старший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)-261-21-44, e-mail: galina.gayda@gmail.com	
Демків Ольга Михайлівна	к.б.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)-261-21-44, e-mail: demkivo@nas.gov.ua	
Закальський Андрій Євстахович	к.б.н., науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)-261-21-44, e-mail: zakalskyae@nas.gov.ua	
Прокопів Тетяна Маркіянівна	к.б.н., науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)2612144, e-mail: tetyanaprokopiv@gmail.com	
Смуток Олег Володимирович	д.б.н., с.д., старший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: +38 032 241 2144, e-mail: smutok@cellbiol.lviv.ua	
Стасюк Наталя Євгенівна	к.х.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)-261-21-44, e-mail: stasuk_natalia@ukr.net	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

Нанозими, синтез, структурно-функціональна характеристика, каталітична активність, іммобілізація на полімерних носіях, діагностичні методи, біологічна дія

14. Резюме

Плановане дослідження «Нанозими: синтез, характеристика та створення на їх основі нових нанокомпозитних матеріалів із каталітичною активністю для медицини» об'єднує кілька суміжних дисциплін (ензимологію, біотехнологію, нанотехнологію, хімію матеріалів, мікробіологію, аналітичну і фізичну хімію) і спрямоване на одержання нових нанокомпозитних матеріалів з каталітичною активністю та дослідження можливості їхнього використання для розробки діагностичних методів та лікувальних засобів.

Метою проєкту є синтез, вивчення структурних і каталітичних властивостей нових біологічно активних матеріалів, а саме штучних ферментів або нанозимів; створення на їх основі нових діагностичних методів та вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні клітини

(дріжджі та культури клітин людини). Створення нових наноматеріалів з каталітичними властивостями (нанооксидази та нанопероксидази) дозволить розробити нові методи високоселективної детекції низки практично важливих речовин для клінічної діагностики, а також, в разі біосумісності нанокompatитних матеріалів, використати їх у ролі лікувальних засобів.

Як показано в недавніх публікаціях, каталітичними властивостями володіють різноманітні природні та синтетичні матеріали – циклодекстрини, комплекси металів, порфірини, полімери, дендромери, які імітують структуру та функції природних ензимів. Досліджено, що деякі наноматеріали теж мають властивості штучних ферментів (нанозимів), каталітичні властивості яких цінні для їх практичного використання. В базі даних *Google Scholar* пошук за ключовим словом «nanozyme» дає 95 тисяч джерел, серед них більша частина публікацій присвячена штучній пероксидазі. Скринінг і скерований синтез таких матеріалів тільки почався, і очікуються привабливі перспективи заміни природних ферментів штучними аналогами у практичній біотехнології і медицині [1-5].

Досконалість і оригінальність проекту базується на ідеї використання комерційно недоступних наночастинок благородних, перехідних та рідкісних металів, у тому числі солей і гібридних форм, одержаних авторами проекту як за допомогою класичних хімічних підходів [6-14], так і методами «зеленого» синтезу [15-18]. У попередніх роботах авторами проведено дослідження, які створили наукову базу для успішного виконання запланованих завдань даного проекту. Синтезовано наночастинки (НЧ) срібла та золота із використанням неорганічних відновників – тринатрій цитрату та натрій боргідриду. Методами скануючої, атомно-силової, трансмісійної електронної мікроскопії та рентгено-структурного аналізу доведено нанорозмірність отриманих AuНЧ, AgНЧ та їх гібридів – Au/AgНЧ і Ag/AuНЧ. За допомогою флуоресцентної електронної мікроскопії показано, що AuНЧ та AgНЧ випромінюють лише синє світло, тоді як гібридні НЧ випромінюють синє, зелене, червоне та інфра-червоне світло. На моделі метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* вивчено токсичний вплив синтезованих НЧ на клітину. Встановлено, що взаємодія НЧ з клітиною залежить від розміру НЧ, тривалості експозиції із клітиною та природи НЧ. Досліджено стабільність свічення НЧ у складі клітини та життєздатність клітин дріжджів, модифікованих НЧ. Показано, що завдяки унікальним флуоресцентним властивостям гібридних НЧ стає можливим спостереження локалізації НЧ всередині клітини та процесу вивільнення цих НЧ із клітини.

Каталітично активні наночастинки, нанозими, які володітимуть властивостями оксидоредуктази (пероксидази, каталази, алкогольоксидази, глюкозооксидази, флавоцитохрому b_2 , лаккази та ін.), буде відібрано з низки синтезованих наноматеріалів, охарактеризовано та застосовано як міметики натуральних ензимів в складі діагностичних наборів для визначення практично важливих аналітів. Нанозими буде іммобілізовано на полімерних носіях і використано для вивчення їх біологічної дії на еукаріотичні організми, зокрема, на клітини дріжджів та культури псевдонормальних клітин людини *in vitro*. За умови успішного синтезу нанозимів із оксидазною активністю, будуть проведені дослідження індукції утворення пероксиду водню після навантаження клітин нанокompatитами та їх інкубації з відповідним субстратом нанооксидази. Позитивний тест дасть можливість рекомендувати такі нанокompatити як стерилізуючі агенти, а також, в разі біосумісності нанокompatитів, для їх використання в якості ліків в ензимотерапії.

Наукові та технічні завдання планованого проекту визначаються наступним чином:

1. Провести скринінг та синтез нових наноматеріалів із оксидоредуктазною активністю;
2. Здійснити структурно-функціональну характеристику нанозимів із оксидоредуктазною активністю;
3. Іммобілізувати нанозими на полімерних, у т.ч. біосумісних носіях. Дослідити каталітичні властивості та стабільність одержаних нанокompatитів;
4. Створити нові діагностичні методи на основі нанозимів;
5. Вивчити біологічну дію нанозимних композитів на еукаріотичні організми.

Науковці відділу аналітичної біотехнології ІБК НАН України (завідувач – д.б.н., професор Гончар М.В.) є професіоналами високого рівня в галузях біотехнології, аналітичної хімії, нанотехнології, мікробіології та ензимології. Дослідники здійснюють інноваційні наукові дослідження, мають адміністративну, організаційну компетентність та наукові публікації в галузі пропонованого проекту [6-24]. У відділі є матеріали та обладнання, необхідні для виконання пропонованого наукового проекту.

Пропонований науковий проєкт заслуговує на увагу завдяки поєднанню фундаментальних наукових досліджень із практикою за використання передових технологій та міждисциплінарних досліджень.

Проєкт базується на досвіді в галузі нанотехнологій, одержанном при виконанні наступних НДР ІБК НАН України, а також індивідуальних грантів:

1) «Вивчення біорозпізнаючих властивостей мікро- і нанорозмірних об'єктів на основі ферментів та генетично модифікованих клітин з метою розробки нових біоаналітичних методів» (№ держреєстрації 0109U000118), 2009-2012 рр.;

2) Нові нанорозмірні елементи біосенсорів на основі оксидоредуктаз» - Українсько-Білоруський проєкт Ф 54.4/031 ДФФД - БРФФД». (№ держреєстрації 0113U002866), 2013-2014 рр.;

3) «Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу та лікування». (№ держреєстрації 0113U000142), 2013-2015 рр.;

4) «Розробка та дослідна експлуатація портативного аналізатора на основі амперометричних ферментних біосенсорів для контролю якості напоїв у виноробстві. Розробка біосенсорних методів аналізу L-Arg у вині за використання аргініно-гідролізуючих рекомбінантних ферментів» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держреєстрації 0113U002555), 2013-2017 рр.

5) «Розробка та оптимізація ферментних електрохімічних біосенсорів на основі нових функціональних наноматеріалів для визначення аргініну та їх застосування для контролю якості плодово-ягідних соків та засобів гігієни. Розділ 3. Розробка референтних методів аналізу аргініну за використання аргініно-гідролізуючих рекомбінантних ферментів» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держреєстрації 0118U006260), 2018-2022 рр.

6) Міжнародний індивідуальний грант FEMS для молодих науковців (Стасюк-2013).

7) Міжнародний індивідуальний грант для молодих науковців від компанії «ОПТЕК» (Стасюк-2014).

Актуальність планованих досліджень пов'язана з потребою в розробці селективних, чутливих і водночас недорогих методів аналізу практично важливих аналітів - біомаркерів найбільш поширених захворювань та індикаторів якості фармацевтичних продуктів. Соціально-економічна значимість результатів планованої роботи полягає у потребі заміни природних ферментів недорогими штучними каталізаторами, зокрема, нанозимами, в складі як біоаналітичних наборів, так і лікувальних засобів.

Кінцевими продуктами даного проєкту будуть нові біологічно активні наноматеріали – штучні ензими, нові методи клінічної діагностики на їх основі, нові перспективні біосумісні біологічно активні нанокompatітні матеріали для адресної доставки ліків в організм. Крім цього, буде зроблено внесок в розвіток фундаментальної науки про життя – буде поглиблено знання стосовно механізмів взаємодії каталітично активних наноматеріалів із живою кліпиною. Очікуваний результат проєкту виходить за рамки існуючого рівня технологій, тому внаслідок виконання проєкту будуть одержані інноваційні результати.

Перелік посилань

1. Huang et al. (2019) Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications. *Chem. Rev.* 119(6): 4357-4412.
2. Gu, Y. *et al.* (2020) Vitamin B₂ functionalized iron oxide nanozymes for mouth ulcer healing. *Sci. China Life Sci.* 63: 68–79
3. Wu J. *et al.* (2019) Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II). *Chem. Soc. Rev.* 48(4): 1004-1076.
4. Jiang D.*et al.* (2019) Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 48: 3683-3704.
5. Golchin *et al.* (2017) Nanozyme applications in biology and medicine: an overview. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 45(6): 1-8.

6. Стасюк Н. та ін. (2011) Синтез та характеристика золотих і срібних наночастинок для іммобілізації рекомбінантної аргінази. Вісник Львівського університету. Серія хімічна. 52: 261-267.
7. Stasyuk N. et al. (2011) Recombinant human arginase I immobilized on gold and silver nanoparticles: preparation and properties. Nanotechnology Development. - 1:e3: 11-15.
8. Stasyuk et al. (2015) Cell Imaging with Fluorescent Bi-Metallic Nanoparticles. Journal of Advances in Chemistry 11(4): 3498-3510.
9. Синенька М.М. та ін. (2014) Іммобілізація оксидоредуктаз на наночастинках золота і срібла. Біологічні студії. 8(3-4): 5-12.
10. Karkovska M. et al. (2015) L-lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome b2-enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches. Talanta 144: 1195-1200.
11. Stasyuk N. et al. (2016) Nanoparticles of noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensor on hydrogen peroxide. Sensor Letters. 14(11-12): 1-9.
12. Smutok O. et al. (2017) Development of a new mediatorless biosensor based on flavocytochrome b2 immobilized onto gold nanolayer for non-invasive L-lactate analysis of human liquids. Sensor & Actuators B. 250: 469-475.
13. Demkiv O et al. (2017) Reagentless amperometric formaldehyde-selective chemosensor based on using platinized gold electrode. Materials. 10(5): 503 (1-11).
14. Stasyuk N. Ye. et al. (2019) Amperometric biosensors based on oxidases and Pt/Ru nanoparticles as artificial peroxidase. Food Chemistry. 285: 213-220.
15. Stasyuk N. et al. (2016) The “green” synthesis of gold nanoparticles by the yeast *Hansenula polymorpha*. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 73: 96-102.
16. Gayda G.Z. et al. (2019) Metallic nanoparticles obtained *via* “green” synthesis as a platform for biosensor construction. Appl. Sci. 9: 720-735.
17. Stasyuk N. et al. (2015b) Non-conventional yeast *Hansenula polymorpha* as a tool for green synthesis of the new bionanomaterials. 27th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (Levico Terme, Italy, September 6 – 12, 2015). P. 257.
18. Gayda G. et al. (2015) “Green” synthesis of nanoparticles by non-conventional yeasts. International conference "Advances in Cell Biology and Biotechnology" (Lviv, Ukraine, October 11 – 13, 2015). P. 54.
19. Карковська та ін. (2017) Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення. У книзі: “Багатофункціональні наноматеріали для біології та медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування” за ред. Р.С. Стойки. Київ: Наук. Думка: 165-177.
20. Gayda G.Z. et al. (2017) Fluorescent nanoparticles of noble metals for cell imaging // В книзі: Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування (Під ред. Р.С. Стойка): 156-165.
21. Kavetskyu T. et al. (2019) Improvement of amperometric laccase biosensor using enzyme-immobilized gold nanoparticles coupling with ureasil polymer as a host matrix. Gold Bulletin, 52 (2): 79-85.
22. Shkotova L. et al. (2019) Amperometric biosensor modified with platinum and palladium nanoparticles for detection of lactate concentrations in wine. SN Applied Sciences. 1: 306.
23. Smutok O. et al. (2019) Non-invasive L-lactate analysis of human liquids using a third generation biosensor based on gold nanolayer and flavocytochrome b₂. In: Human Health: Realities and Prospects. Monographic series. Volume 4. “Health and Biosensors” (N. Skotna, S. Voloshanska, T. Kavetskyu, O. Smutok, M. Gonchar, eds.), Drohobych: Posvit : 8-20.
24. Kavetskyu T. et al. (2020) Microporous carbon fibers as electroconductive immobilization matrixes: Effect of their structure on operational parameters of laccase-based amperometric biosensor. Mater. Sci. Eng. C, 109:110570.

15. Обґрунтування доцільності виконання роботи

15.1. Цілі та завдання роботи, її актуальність, соціальна та економічна значимість.

Наукові завдання проєкту визначаються наступним чином:

1. Провести скринінг та синтез нових наноматеріалів із оксидоредуктазною активністю;

2. Здійснити структурно-функціональну характеристику нанозимів із оксидоредуктажною активністю;
3. Імобілізувати нанозими на полімерних, у т.ч. біосумісних носіях. Дослідити каталітичні властивості та стабільність одержаних наноконструкцій;
4. Створити нові діагностичні методи на основі нанозимів;
5. Вивчити біологічну дію нанозимних конструцій на еукаріотичні організми;

Плановане дослідження об'єднує кілька суміжних дисциплін (ензимологію, біотехнологію, нанотехнологію, хімію матеріалів, мікробіологію, аналітичну і фізичну хімію) і спрямоване на одержання нових наноконструктивних матеріалів із каталітичною активністю та дослідження можливості їхнього використання для розробки нових простих та недорогих діагностичних методів та створення принципово нових лікувальних засобів – нанозимів. Пропонований науковий проєкт органічно поєднує фундаментальні наукові дослідження та інноваційні практичні розробки завдяки використанню передових технологій та міждисциплінарних методичних прийомів.

Завдяки залученню для проведення більшості наукових досліджень студентів та молодих вчених, пропонований проєкт має значний соціально-виховний вплив і створює сприятливі умов для набуття молоддю важливого наукового-практичного досвіду та кар'єрного росту.

15.2. Стан розроблення проблеми.

Нанотехнологія є інноваційною галуззю науки, яка впливає на різноманітні сучасні технології. Наноматеріали (НМ), органічні і неорганічні, застосовуються в різних сферах життєдіяльності, зокрема, в медицині. Неорганічні НМ зокрема, магнітні наночастинки (НЧ), НЧ благородних металів (золото, срібло, платина, паладій) і напівпровідникові НЧ (оксиди титану, цинку) останнім часом широко використовуються в якості каталізаторів, напівпровідників, в складі оптичних пристроїв, електрохімічних біосенсорів, носіїв для доставки ліків, а також як контрастуючі агенти в діагностичних цілях (Wu J. et al. 2019). Тому дослідження методів їх одержання, характеристики та перспектив використання привертає значну увагу дослідників. Найбільш вивченими є НЧ золота, які ще в XVI столітті використовували для медичних цілей. НЧ срібла, алюмінію, золота, цинку, вуглецю, титану, паладію, заліза, фулеренів і міді є найбільш перспективними сполуками для застосування в медицині, зазвичай, як антибактерійні, антивірусні, антифунгіцидні агенти (He et al. 2014; Kłebowski et al. 2018). І цей напрям – пошук «штучних антибіотиків» та дезінфектантів – буде стрімко розвиватись, оскільки резистентність людей до існуючих антибіотиків проти збудників різноманітних хвороб щорічно катастрофічно зростає (Kraker et al. 2016). В модельних дослідах на тваринах показано, що НЧ благородних металів можуть також застосовуватись як активатори/підсилювачі в радіотерапії, а магнітні НЧ - в гіпертермії злоякісних захворювань (He et al. 2014; Moghaddam et al. 2015; Kłebowski et al. 2018).

В останні роки з'явився новий напрям досліджень НЧ благородних та перехідних металів, пов'язаний з їх каталітичними властивостями. Відомо, що каталітичними властивостями володіють різноманітні природні та синтетичні матеріали – циклодекстрини, комплекси металів, порфірини, полімери, дендромери, які імітують структуру та функції природних ензимів. Показано, що деякі НМ теж мають властивості штучних ферментів (нанозимів), каталітичні властивості яких цінні для їх практичного використання.

Ензими – біологічні каталізатори, які відіграють ключову роль в біологічних процесах і давно стали незамінними інструментами багатьох хімічних і біотехнологічних процесів, широко використовуються в сільському господарстві та медицині. Ензиматичні реакції – високоселективні відносно субстратів і характеризуються надзвичайно високою каталітичною активністю. Проте природні ферменти, як правило, мають обмежену хімічну та біологічну стабільність, високу вартість, що пов'язано зі складними технологіями їх виділення та очищення з біологічних джерел.

При кінці минулого століття були винайдені штучні замітники ферментів (Sharma & Bachwani, 2011). Сюди відносяться циклодекстрини з каталітичною активністю, абзими (антитіла з каталітичною активністю), синзими (синтетичні аналоги ензимів), аптамери (ДНКзими та РНКзими). Вони, як правило, стабільніші, ніж природні ферменти, проте поступаються їм за каталітичною активністю і теж високовартісні через складні технології синтезу.

Скринінг і скерований синтез найновіших функціональних наноматеріалів - нанозимів (НЗ) тільки почався, і очікуються привабливі перспективи заміни природних ферментів штучними аналогами у практичній біотехнології і медицині (Wei & Wang, 2013; Gao & Yan, 2013; Lin et al., 2014; Shin et al., 2015; Qu et al., 2018; Wu et al., 2019; Huang et al., 2019). В базі даних Google Scholar пошук за ключовим словом «nanozyme» дає 95 тис. джерел, з них більша частина публікацій присвячена штучній пероксидазі. Серед НМ, які володіють пероксидазною активністю, першими були відкриті феромагнітні НЧ (Gao et al., 2007 р.). Число таких матеріалів постійно росте, включаючи НЧ золота (Lin et al., 2014; Han et al., 2017), композицію карбоновий електрод-Берлінська блакить (Karyakin & Karyakina, 1999; Karyakin et al., 2000), нанотрубки Карбону-Берлінська блакить (Sajjadi S. et al. 2017), нанокарбоновий електрод-Берлінська блакить (Clausmeyer et al., 2014), функціоналізований фулерен (Afreem et al., 2015), нафійон-цитохром *c* (Hong et al., 2012), супрамолекулярні комплекси гідрогелю (Rui et al., 2015), НЧ церію (Neal et al., 2017), НЧ Fe/Au (Bustami et al., 2017), наноконплекси лантанідів (Zeng et al., 2016) та ін. Найдокладніше сучасні дані про НЗ на основі наночастинок металів підсумовано в огляді Wu J. et al. (2019). Серед описаних нанозимних матеріалів є каталізатори з різною реакційною специфічністю; перш за все, це оксидоредуктази – пероксидази (Carmona-Ribeiro et al., 2015), каталаза, глюкозооксидаза, сульфітоксидаза, супероксиддисмутаза, а також протеази, ДНК-ази, NO-синтази та ін. (Wang et al., 2016).

НЗ із пероксидазною (ПО) активністю мають значний потенціал в різноманітному використанні, а саме, в клінічній діагностиці для визначення глюкози, спиртів і перексиду водню, імунологічних тестах, в біореакторах для знешкодження забруднювачів навколишнього середовища та для обробки стічних вод, як робочий елемент в біопаливних комірках для генерування електричної енергії. Передбачається, що багато нових вискоефективних НЗ будуть синтезовані для розширення їх застосування. Хоча спостерігається стрімкий прогрес у розробці НЗ, залишається неясним, наскільки придатні ці матеріали для використання *in vivo* і в клініці. На сьогодні немає впевненості, що НЗ можуть повністю замінити природні ферменти в ензимотерапії – з точки зору ефективності лікування та безпеки для організму людини. Усі ферменти організму працюють взаємозалежно як цілісна система, будь-які штучні альтернативи, в тому числі НЗ, можуть викликати серйозні побічні ефекти, зокрема, цитотоксичність, імунні відгуки та т. ін. Крім того, надмірне виробництво активних форм кисню (АФК) може бути шкідливим для здоров'я, спричиняючи індукування окисного стресу, окислення ліпідів, і пошкодження ДНК (He et al., 2014). Таким чином, необхідні додаткові всебічні дослідження для з'ясування ефективності і безпеки використання НЗ як лікувальних засобів.

З іншого боку, АФК є звичайними продуктами метаболізму клітин. Надлишок АФК та їх похідних є маркерами багатьох патогенних станів, а саме, хвороби Альцгеймера, Паркінсона, інфаркту міокарда, інсульту, ревматоїдного артриту, запалень різного роду, зокрема, викликаних травмою (Hall et al. 1992). У вогнищі запалення процеси, обумовлені дією вільних радикалів, значно активуються і можуть призвести до нейродегенерації і загибелі клітин. Введення антиоксидантних препаратів негайно після травми, яка спричиняє посттравматичну загибель клітини за рахунок неконтрольованого перекисного окислення, може загальмувати/інгібувати цей процес (Batinic-Haberle et al. 2016). До антиоксидантних препаратів відносяться ферменти СОД, каталаза, глутатіонпероксидаза та ін. Але введення в організм нативних ферментів не є ефективним. Оскільки вони швидко інактивуються шляхом протеолізу. Для запобігання інактивації ферментів та підвищення їх стабільності, ферменти кон'югують з полімерними носіями, зокрема, з поліетиленгліколем (Beckman et al. 1988; Veronese et al. 2002; Knop et al. 2010), полілактогліколевими НЧ на основі кополімеру D,L-лактид-гліколю (Reddy & Labhasetwar 2009; Jiang & Schwendeman 2008); включають в ліпосоми (Jiang et al. 1999) або захисні наноконтейнери (Klyachko et al. 2012). Однак така модифікація призводить до збільшення розмірів ферментного препарату і значно знижує ефективність його доставки скрізь мікросудини в цільову зону. До того ж, одержані такими способами конюгати є недостатньо стабільними в кровотоці та можуть викликати імунну і/або токсичну реакцію у хворих (Alkaff et al. 2020; Andrabi et al. 2020).

Отже, нанозими завдяки своїй каталітичній активності можуть знайти широке практичне використання в наукових дослідженнях, біотехнологічній і харчовій промисловості, клінічній діагностиці та фармакології (Golchin et al., 2017; Huang et al., 2019; Jiang et al., 2019; Liu et al., 2019). Крім застосування в діагностичних тестах, нанозими - перспективні каталітичні складові терапевтичних

препаратів (Wang et al., 2016; Liu et al., 2019; Jiang et al. 2020; Gu et al., 2020), у тому числі для лікування злякисних захворювань. Водночас, їх використання в якості терапевтичних препаратів потребує більш ґрунтовних досліджень, на які сфокусований пропонований проект.

Перелік посилань:

- Adegoke O., Park E.Y. (2016) The use of nanocrystal quantum dot as fluorophore reporters in molecular beacon-based assays. *Nano Convergence*. 3: 1-13.
- Alkaff S.A. et al. (2020) Nanocarriers for Stroke Therapy: Advances and Obstacles in Translating Animal Studies. *Int J Nanomedicine*. 15: 445–464.
- Andrabi S.S. , et al. (2020) Nanoparticles with antioxidant enzymes protect injured spinal cord from neuronal cell apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction. *J Control Release*. 317: 300-311.
- Batinić-Haberle I. et al. eds. (2016) *Redox-Active Therapeutics*. Springer, 694 pp. EISBN 3319307053, 9783319307053
- Beckman J.S. et al. (1988) Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J. Biol. Chem*. 263: 6884- 6892.
- Besson M., Gallezot P. (2000) Selective oxidation of alcohols and aldehydes on metal catalysts. *Catalysis Today*, 57(1-2):127-141.
- Bustami Y. et al. (2017) Manipulation of Fe/Au Peroxidase-Like Activity for Development of a Nanocatalytic-Based Assay. *Journal of Engineering Science*. 13: 29-52.
- Carabineiro S.A.C. (2019) Supported Gold Nanoparticles as Catalysts for the Oxidation of Alcohols and Alkanes. *Front Chem*. 7:702.
- de Kraker Marlieke E. A. et al. (2016) Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050, *PLoS Med*. 13(11): e1002184.
- Feng B. et al. (2010) Functionalized poly(ethylene glycol)-stabilized water-soluble palladium nanoparticles: property/activity relationship for the aerobic alcohol oxidation in water. *Langmuir*. 26(4): 2505-2513.
- García-Suárez E.J. et al. (2013) Carbon-supported palladium and ruthenium nanoparticles: application as catalysts in alcohol oxidation, cross-coupling and hydrogenation reactions. *Recent Pat Nanotechnol*. 7(3): 247-264.
- Golchin J. et al. (2017) Nanozyme applications in biology and medicine: an overview. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*. 45(6): 1-8.
- Gonchar M.V. et al. (1990) Catalase-minus mutants of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* impaired in regulation of alcohol oxidase synthesis. Abstract book of conf. "Genetics of Respiratory Enzymes in Yeast" (eds. Lachowicz and Karpaz, Wrocław University press, Poland): 222-228.
- Gu Y. et al. (2020) Vitamin B₂ functionalized iron oxide nanozymes for mouth ulcer healing. *Sci. China Life Sci*. 63: 68-79.
- Hall E.D. et al. (1992) Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidants in acute brain and spinal cord injury. *J. Neurotrauma* .9: 425-442.
- Han K.N. et al. (2017) Gold nanozyme-based paper chip for colorimetric detection of mercury ions. *Sci. Reports*. 7(1): 2806.
- He W. et al. (2014) Enzyme-Like Activity of Nanomaterials. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. 32(2): 186-211.
- Huang Y. et al. (2019) Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and .*Chem. Rev*. 119(6): 4357-4412.
- Jiang B. et al. (2020) Ferritins as natural and artificial nanozymes for theranostics. *Nanotheranostics*. 10(2): 687-706.
- Jiang D. et al. (2019) Nanozyme: new horizons for responsive biomedical applications. *Chem. Soc. Rev*. 48: 3683-3704.
- Jiang M.L. et al. (1999) Intravenous administration of superoxide dismutase entrapped in long circulating liposomes: in vivo fate in a rat model of adjuvant arthritis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1419: 325-334.
- Jiang W., Schwendeman S.P. (2008) Stabilization of tetanus toxoid encapsulated in PLGA microspheres. *Mol. Pharm*. 5: 808-817.
- Kanbak-Aksu S. et al. (2012) Ferritin-supported palladium nanoclusters: selective catalysts for aerobic oxidations in water. *Chem. Commun. (Camb)*. 48(46):5745-5747.

- Karyakin A.A., Karyakina E.E. (1999) Prussian blue-based 'artificial peroxidase' as a transducer for hydrogen peroxide detection. Application to biosensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*. 57(1-3): 268-273.
- Kłębowski B. et al. (2018) Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. *Int. J. Mol. Sci*. 19(12): 4031.
- Klyachko N.L. et al. (2012) Crosslinked antioxidant nanozymes for improved delivery to CNS. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 8:119-129.
- Knop K. et al. (2010) Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives. *ngew. Chem. Int. Ed.* 49: 6288-6308.
- Kosman J., Juskowiak B. (2017) Bioanalytical Application of Peroxidase-Mimicking DNAzymes: Status and Challenge. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1-26.
- Lin Y. et al. (2014) Catalytically Active Nanomaterials: A Promising Candidate for Artificial Enzymes. *Acc. Chem. Res.* 47(4): 1097-1105.
- Liu X. et al. (2019) Therapeutic Applications of Multifunctional Nanozyme. *Nanoscale*. 11: 21046-21060.
- Lushchak V. (2010) Oxidative Stress in Yeast. *Biokhimiya*. 75: 281-296.
- Moghaddam A.B. et al. (2015) Nanoparticles Biosynthesized by Fungi and Yeast: A Review of Their Preparation, Properties, and Medical Applications. *Molecules*. 20(9): 16540-16565.
- Petro M. et al. (2016) Tissue plasminogen activator followed by antioxidant-loaded nanoparticle delivery promotes activation/mobilization of progenitor cells in infarcted rat brain. *Biomaterials*. 81:169-180.
- Reddy M.K., Labhasetwar V. (2009) Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 23:1384-1395.
- Rui Q. et al. (2015) Artificial Peroxidase/Oxidase Multiple Enzyme System Based on Supramolecular Hydrogel and Its Application as a Biocatalyst for Cascade Reactions. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 7(30): 16694-16705.
- Sharma V., Bachwani M. (2011) Artificial Enzymes: A Review. *Current Enzyme Inhibition*. 7: 178-189.
- Shin H.Y. et al. (2015) Recent Research Trends and Future Prospects in Nanozymes. *Journal of Nanomaterials*. 11p.
- Su S. et al. (2016) Uniform Au@Pt core-shell nanodendrites supported on molybdenum disulfide nanosheets for the methanol oxidation reaction. *Nanoscale*. 8(1):602-608.
- Teramoto N. et al. (2001) Peroxidase activity of in vitro-selected 2'-amino RNAs. *Biotechnol. Bioeng.* 75(4): 463-468.
- Travascio P. et al. (1998) DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex. *Chem. Biol.* 5(9): 505-517.
- Tupe R.S. et al. (2019) induces glycation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Microbiol.* 69: 1165-1175.
- Veerakumar P et al. (2019) Catalytic Activity of Bimetallic (Ruthenium/Palladium) Nano-alloy Decorated Porous Carbons Toward Reduction of Toxic Compounds. *Chem Asian J.* 14(15): 2662-2675.
- Veronese F.M. et al. (2002) Polyethylene glycol-superoxide dismutase, a conjugate in search of exploitation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 587-606.
- Wang S. et al. (2019) Hollow Prussian Blue nanocubes as peroxidase mimetic and enzyme carriers for colorimetric determination of ethanol. *Mikrochim Acta*. 186(11): 738.
- Wang X. et al. (2016) Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond. *Inorg. Chem. Frontiers*. 3: 41-60.
- Wei H., Wang E. (2013) Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42: 6060-6093.
- Wittstock A., Bäumer M. (2014) Catalysis by unsupported skeletal gold catalysts. *Acc Chem Res.* 47(3): 731-739.
- Wu J. et al. (2019) Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): Next-generation artificial enzymes (II). *Chem. Soc. Rev.* 48(4): 1004-1076.
- Zeng H.-H. et al. (2016) Lanthanide Coordination Polymer Nanoparticles as an Excellent Artificial Peroxidase for Hydrogen Peroxide Detection. *Anal. Chem.* 88(12): 6342-6348.
- Zhao Y. et al. (2020) Glucose Oxidase-Loaded Antimicrobial Peptide Hydrogels: Potential Dressings for Diabetic Wound. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 20(4): 2087-2094.

15.3. Досвід і доробок авторів.

Проект базується на багаторічному досвіді науковців відділу аналітичної біотехнології ІБК НАНУ, накопиченому в результаті досліджень сфокусованих на новітніх нанобіотехнологіях, а саме, під час виконання наступних проектів НДР ІБК НАН України, а також індивідуальних грантів:

1) «Вивчення біорозпізнаючих властивостей мікро- і нанорозмірних об'єктів на основі ферментів та генетично модифікованих клітин з метою розробки нових біоаналітичних методів» (№ держреєстрації 0109U000118), 2009-2012 рр.;

2) Нові нанорозмірні елементи біосенсорів на основі оксидоредуктаз» – Українсько-Білоруський проект Ф 54.4/031 ДФФД - БРФФД». (№ держреєстрації 0113U002866), 2013-2014 рр.;

3) «Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу та лікування». (№ держреєстрації 0113U000142), 2013-2015 рр.;

4) «Розробка та дослідна експлуатація портативного аналізатора на основі амперометричних ферментних біосенсорів для контролю якості напоїв у виноробстві. Розробка біосенсорних методів аналізу L-Arg у вині за використання аргініно-гідролізуючих рекомбінантних ферментів» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держреєстрації 0113U002555), 2013-2017 рр.;

5) «Розробка та оптимізація ферментних електрохімічних біосенсорів на основі нових функціональних наноматеріалів для визначення аргініну та їх застосування для контролю якості плодово-ягідних соків та засобів гігієни. Розділ 3. Розробка референтних методів аналізу аргініну за використання аргініно-гідролізуючих рекомбінантних ферментів» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держреєстрації 0118U006260), 2018-2022 рр.;

6) Міжнародний індивідуальний грант FEMS для молодих науковців (Стасюк-2013).

7) Міжнародний індивідуальний грант для молодих науковців від компанії «ОПТЕК» (Стасюк-2014).

У попередніх роботах нами проведено дослідження, які створили наукову базу для успішного виконання запланованих завдань даного проекту. Було синтезовано наночастинки (НЧ) срібла та золота із використанням неорганічних відновників – тринатрій цитрату та натрій боргідриду. Методами скануючої, атомно-силової, трансмісійної електронної мікроскопії та рентгено-структурного аналізу доведено нанорозмірність отриманих AuНЧ, AgНЧ (Stasyuk et al., 2011), та їх гібридів – Au/AgНЧ і Ag/AuНЧ (Stasyuk et al., 2015). За допомогою флуоресцентної електронної мікроскопії показано, що AuНЧ та AgНЧ випромінюють лише синє світло, тоді як гібридні НЧ випромінюють синє, зелене, червоне та інфра-червоне світло (Stasyuk et al., 2015; Gayda et al. 2017). На моделі метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* вивчено токсичний вплив синтезованих НЧ на клітину. Встановлено, що взаємодія НЧ з клітиною залежить від розміру НЧ, тривалості експозиції із клітиною та природи НЧ. Досліджено стабільність свічення НЧ у складі клітини та життєздатність клітин дріжджів, модифікованих НЧ. Показано, що завдяки унікальним флуоресцентним властивостям гібридних НЧ стає можливим спостереження локалізації НЧ всередині клітини та процесу вивільнення цих НЧ із клітини (Stasyuk et al., 2015; Gayda et al. 2017). Згідно даним літератури, НЧ благородних металів, зокрема AgНЧ, AuНЧ та їх гібриди є ефективними носіями для доставки різноманітних ліків, включаючи серцево-судинні, анальгетики, інгібітори протеаз та протиракові препарати завдяки їх біосумісності, неімуногенності і швидкому вивільненню з організму. В разі виявлення у цих НЧ властивостей оксидоредуктаз, вони можуть бути перспективними лікарськими засобами.

Альтернативною фізико-хімічним методам отримання НЧ є біологічні способи синтезу. Головна перевага «зеленого» синтезу для одержання НЧ – економічна ефективність та біологічна безпека процесу одержання кінцевого продукту. Автори планованого проекту у попередніх дослідженнях вперше вивчили та описали феномен «зеленого» синтезу наночастинок Cr₂O₃- шляхом позаклітинної біоредукції Cr(VI) деякими дріжджами. Показано, що одержані Cr (III)-біокомплекси склались з

Cr₂O₃-НЧ і органічних метаболітів дріжджів, у тому числі білків. Ці біоНЧ було ізольовано, сконцентровано різними методами та досліджено (Ksheminska et al. 2010, 2011; Smutok et al. 2011; Кшемінська та ін. 2015). Аналогічні досліди було проведено з різноманітними НЧ.

Основні публікації авторського колективу відділу за темою проекту:

1. Ksheminska H.P. et al. (2010) The Chromate Resistance Phenotype of Some Yeast Mutants Correlates with a Lower Level of Cr(V)-Species Generated in the Extra-Cellular Medium *BioMetals*. 23: 633-642.
2. Ksheminska H.P. et al. (2011) Chromate-Resistant Mutants of the Yeast *Pichia guilliermondii*: Selection and Properties *Mikrobiologiya (Moscow)*. 80(3): 314-325.
3. Smutok et al. (2011) Chromate reducing activity of the *Hansenula polymorpha* recombinant cells overproducing flavocytochrome *b₂*. *Chemosphere*. 83(4): 449-54.
4. Стасюк Н. та ін. (2011) Синтез та характеристика золотих і срібних наночастинок для іммобілізації рекомбінантної аргінази. *Вісник Львівського університету. Серія хімічна*. 52: 261-267.
5. Stasyuk N. et al. (2011) Recombinant human arginase I immobilized on gold and silver nanoparticles: preparation and properties. *Nanotechnology Development*. 1:3: 11-15.
6. Синенька М.М. та ін. (2014) Іммобілізація оксидоредуктаз на наночастинках золота і срібла. *Біологічні студії*. 8(3-4): 5-12.
7. Stasyuk et al. (2014) mMethylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)₆-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles. *BioMed Research International*. 2014, ID 480498, :8.
8. Stasyuk et al. (2015) Cell Imaging with Fluorescent Bi-Metallic Nanoparticles. *Journal of Advances in Chemistry* 11 (4): 3498-3510.
9. Karkovska M. et al. (2015) L-lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome *b₂*-enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches. *Talanta* 144: 1195-1200.
10. Stasyuk N. et al. (2016) Nanoparticles of noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensor on hydrogen peroxide *Sensor Letters*. 14(11-12): 1-9.
11. Карковська М.І. та ін. (2016) Використання флавоцитохрому *b₂*, іммобілізованого на магнітних мікрочастинках, в багатократному ензиматичному аналізі L-лактату. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 72: 25-32.
12. Stasyuk N. et al. (2016) The “green” synthesis of gold nanoparticles by the yeast *Hansenula polymorpha*. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 73: 96-102.
13. Smutok O. et al. (2017) Development of a new mediatorless biosensor based on flavocytochrome *b₂* immobilized onto gold nanolayer for non-invasive L-lactate analysis of human liquids. *Sensor & Actuators B*. 250: 469-475.
14. Demkiv O et al. (2017) Reagentless amperometric formaldehyde-selective chemosensor based on using platinized gold electrode. *Materials*. 10(5): 503 (1-11).
15. Карковська та ін. (2017) Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення. У книзі: “Багатофункціональні наноматеріали для біології та медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування” за ред. Р.С. Стойки. Київ: Наук. Думка : 165-177.
16. Gayda G.Z. et al. (2017) Fluorescent nanoparticles of noble metals for cell imaging // В книзі: Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування (Під ред. Р.С. Стойка): 156- 165.
17. Kavetskyu T. et al. (2019) Improvement of amperometric laccase biosensor using enzyme-immobilized gold nanoparticles coupling with ureasil polymer as a host matrix. *Gold Bulletin*, 52 (2): 79-85.
18. Shkotova L. et al. (2019) Amperometric biosensor modified with platinum and palladium nanoparticles for detection of lactate concentrations in wine. *SN Applied Sciences*. 1: 306.
19. Smutok. O. et al. (2019) Non-invasive L-lactate analysis of human liquids using a third generation biosensor based on gold nanolayer and flavocytochrome *b₂*. In: *Human Health: Realities and Prospects. Monographic series. Volume 4. “Health and Biosensors”* (N. Skotna, S. Voloshanska, T. Kavetskyu, O. Smutok, M. Gonchar, eds.), Drohobych: Posvit : 8-20.

20. Stasyuk N.Ye. et al. (2019) Amperometric biosensors based on oxidases and Pt/Ru nanoparticles as artificial peroxidase. Food Chemistry. 285: 213-220.
21. Gayda G.Z. et al. (2019) Metallic nanoparticles obtained *via* "green" synthesis as a platform for biosensor construction. Appl. Sci. 9: 720-735.
22. Kavetsky et al. (2020) Microporous carbon fibers as electroconductive immobilization matrixes: Effect of their T. structure on operational parameters of laccase-based amperometric biosensor. Mater. Sci. Eng. C, 109:110570.

15.4. Структура досліджень.

Плановане дослідження об'єднує кілька суміжних дисциплін (ензимологію, біотехнологію, нанотехнологію, хімію матеріалів, мікробіологію, аналітичну і фізичну хімію) і спрямоване на одержання нових нанокомпозитних матеріалів із каталітичною активністю та дослідження можливості їхнього використання для розробки нових діагностичних методів та створення принципово нових лікувальних засобів - нанозимів. Пропонований науковий проєкт органічно поєднує фундаментальні наукові дослідження та інноваційні практичні розробки завдяки використанню передових технологій та міждисциплінарних методичних прийомів.

Проєкт складається із 5-и етапів:

1 етап виконання проєкту в 2020 р. "**Скринінг та синтез нових наноматеріалів із оксидоредуктажною активністю**" буде проведено скринінг синтезованих у попередніх дослідженнях нанокомпозитних матеріалів на наявність каталітичної активності оксидоредуктаз (пероксидази, оксидази, каталази, супероксиддисмутази, лаккази). Буде одержано нові наночастинки (НЧ) благородних, перехідних та рідкісних металів, у тому числі їх гібридні форми методами хімічного відновлення відповідних солей та "зеленого" синтезу. Будуть синтезовані різноманітні наноматеріали на основі фероціанідних солей заліза (Пруська блакить), а також на базі аналогічних солей міді і кобальту. Будуть отримані похідні геміну та флавінів, іммобілізовані на поверхні нанокомпозитних матеріалів. Після первинного скринінгу на відповідну псевдоензиматичну активність, каталітично активні наноматеріали (нанозими) буде відібрано для подальших досліджень.

2 етап 2021 р. "**Структурно-функціональна характеристика нанозимів із оксидоредуктажною активністю**" буде проведено структурну характеристику нанозимів (НЗ) за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, флуоресцентної мікроскопії, атомно-силової спектроскопії, рентгено-спектрального аналізу та *динамічного світлорозсіювання*. Буде здійснено функціональну характеристику одержаних штучних ензимів (НЗ), а саме, буде докладно вивчено їхню субстратну специфічність та каталітичні властивості у порівнянні із природними прототипами. Буде вивчено стабільність НЗ у водних розчинах та оптимізовано методи їх зберігання/стабілізації у розчинах, близьких до фізіологічних. Буде відібрано для подальших досліджень НЗ, які можуть слугувати штучними заміниками практично важливих ферментів – пероксидази, каталази, супероксиддисмутази, лаккази, глюкозооксидази, алкогольоксидази або флавоцитохромом b_2 .

3 етап – 2022 р. "**Іммобілізація нанозимів на полімерних (у т.ч. біосумісних) носіях та дослідження каталітичних властивостей і стабільності нанозимів у розчині та в іммобілізованому стані**" буде опрацьовано способи та умови іммобілізації НЗ, які було відібрано на 2-му етапі, на різних полімерних носіях (фізична сорбція та ковалентні методи). В якості носіїв НЗ буде досліджено похідні карбонізованої целюлози, поліетиленімін, поліетиленгліколь, поліамідоамін, полі-L-лізін та інші, а також біосумісні носії циклодекстрин і хітозан. Головними критеріями відбору оптимального носія слугуватимуть наступні характеристики: розчинність у водних середовищах; нетоксичність; здатність до біодеградації; збереження/підвищення питомої каталітичної активності кінцевих продуктів «НЗ-носій»; забезпечення стабільності колоїдного стану сполук «НЗ-носій», тобто запобігання їх агрегації. Методом *динамічного світлорозсіювання* буде контролюватись розміри одержаних матеріалів «НЗ-носій» за їх дзета-потенціалами, у порівнянні з параметрами відповідних вихідних НЗ. Буде здійснено функціональну характеристику НЗ, зв'язаних з полімерними носіями («НЗ-

носій»), зокрема, буде докладно вивчено їхню субстратну специфічність та каталітичні властивості у порівнянні з вихідними НЗ.

4 етап – 2023 р. "**Створення нових діагностичних методів на основі нанозимів**" дослідження будуть спрямовані на розробку методів високоселективної детекції низки практично важливих речовин для клінічної діагностики та фармакології. За використання найбільш ефективних нанозимів – міметиків алкогольоксидази, глюкозооксидази, флавоцитохрому *b₂*, лаккази буде створено нові спектрофотометричні (та/або флуоресцентні) методи аналізу біологічних рідин людини (на вміст етанолу, метанолу, формальдегіду, глюкози, L-лактату) та деяких фармацевтичних препаратів (на вміст фенольних похідних, зокрема, деяких вітамінів та антиоксидантів). За використання найбільш ефективних міметиків пероксидази та комерційної глюкозооксидази (як моделі нанооксидази) буде створено та апробовано на реальних зразках спектрофотометричні методи аналізу глюкози.

5 етап – 2024 р. "**Вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні організми**" вивчення біологічної дії НЗ буде проводитись на 2-х моделях еукаріотичних організмів: на клітинах дріжджів та культурах псевдонормальних клітин людини *in vitro*. Буде вивчатись можлива токсичність нанозимних композитів (за впливом на швидкість росту клітин) та ефективність їх поглинання клітинами (за допомогою спектральних методів), а також локалізація (сканувальна електронна мікроскопія) і каталітична активність НЗ в клітинах. Для тестування каталазної активності синтезованих нанозимів буде використано оригінальну модель – мутант метилотрофних дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), створений у відділі (Gonchar et al., 1990; Gayda et al., 2019), який характеризується порушеною катаболічною репресією синтезу алкогольоксидази та повною відсутністю каталазної активності. У зв'язку з генетичним блоком каталази, цей мутант не здатен рости на метанолі як єдиному джерелі Карбону і енергії. Отже, функціональність нанозимів з каталазною активністю *in vivo* можна легко тестувати за відновленням здатності клітин до росту на метанолі після поглинання нанозимних частинок.

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Відділ аналітичної біотехнології має матеріальне і апаратне забезпечення для культивування клітин мікроорганізмів (культуральні середовища, стерильні бокси, автоклави, термостати, термостатовані струшувачі, дезінтегратори, центрифуги «Sorvall», «Eppendorf», ліофілізатор «Christ alpha 1-2 LDplus»); для виділення, очищення ферментів і дослідження їх фізико-хімічних і кінетичних характеристик (хроматографічні колонки, сорбенти, прилади для вертикального електрофорезу білків VE-2M «Хелікон», перистальтичні помпи, колектори фракцій, холодильники,); для синтезу та характеристики мікро- та наночастинок (атомно-силовий мікроскоп «Solver P47-PRO (NT-MDT)», скануючий електронний мікроскоп «SEM-microanalyser REMMA-102-02» трансмісійний електронний мікроскоп «PEM-100», флуоресцентний мікроскоп «Axio Lab. A1», оптичні мікроскопи, спектрофотометр «SHIMADZU UV-1650», флуориметр «Quantech filter»); для дослідження вмісту субстратів - ензиматичні набори та біосенсиори (для аналізу метанолу, формальдегіду, глюкози, L-лактату та фенолів).

16. Техніко-економічне обґрунтування

інформація відсутня

17. Власна оцінка науково-технічного рівня розробки, що пропонується, яка очікується за результатами наукової, науково-технічної роботи

- | | |
|-------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги |
| <input checked="" type="checkbox"/> | немає аналогів в Україні |
| <input type="checkbox"/> | краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками |
| <input type="checkbox"/> | перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками |

18. Використання результатів роботи

18.1. Очікувані наукові та науково-практичні результати, об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), які плануються до впровадження після завершення роботи

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Нові наноматеріали із нанозимною активністю для клінічної діагностики та біомедичного застосування;	Інститут патології крові та трансфузійної ме-дицини НАМН України (Львів)	4-6 зразків нанозимів
Нові набори для аналізу глюкози, спирту та молочної кислоти в зразках рідин людини.	Інститут патології крові та трансфузійної ме-дицини НАМН України (Львів)	100 наборів

18.2. Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання роботи

Запропоновані нанозими, завдяки своїй каталітичній активності, мають значний потенціал і зможуть знайти широке практичне впровадження в різних галузях: біотехнологічній і харчовій промисловості, клінічній діагностиці, фармакології, медицині та захисту довкілля. Крім застосування в діагностичних наборах для визначення деяких фізіологічних маркерів людини, нанозими також можуть використовуватись як перспективні каталітичні складові терапевтичних препаратів, у тому числі при лікуванні злоякісних захворювань. Нанозими із пероксидазною та каталазою активністю є надзвичайно перспективними високочутливими елементами новітніх хемо- та біосенсорів, як робочі елементи біопаливних комірок для генерування дешевої альтернативної електроенергії. Вони можуть знайти впровадження в складі вискоелективних та стабільних біореакторів для знешкодження токсичних речовин промислових стічних вод та для знешкодження рівня забруднення природних водоносних джерел.

18.3. Потенційні споживачі наукових та науково-технічних результатів, об'єктів права інтелектуальної власності (ОІВ)

Країна	Назва підприємства, організації	Найменування результатів, ОІВ	Можливі обсяги споживання
Україна	Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України	Діагностичні набори на основі нанозимів для кількісного аналізу глюкози, молочної кислоти та етанолу в зразках рідин людини	100 наборів
Україна	Клініко-діагностичні лабораторії державного та приватного сектору	Діагностичні набори на основі нанозимів для кількісного аналізу глюкози, молочної кислоти та етанолу в зразках рідин людини	5000 наборів
Україна	Біотехнологічні лабораторії виробництв, що потребують контролю вмісту глюкози, молочної кислоти чи етанолу на різних етапах виробництва чи у зразках готової продукції	Діагностичні набори на основі нанозимів для кількісного аналізу глюкози, молочної кислоти та етанолу	5000 наборів

19. Об'єкти права інтелектуальної власності (ОІВ), використання яких передбачається під час проведення досліджень (для прикладних досліджень та фундаментальних, де використовуються ОІВ)

Реєстраційний номер патенту, свідоцтва, країна (для ОІВ, набуття прав на які засвідчується охоронним документом)	Назва необхідного патенту, ноу-хау, об'єкта авторського права та інших ОІВ	Творець ОІВ	Вид наявних прав (виключні майнові права, виключна, невиключна, проста ліцензія) чи є потреба в одержанні прав на використання
WO2009009656, США	Flavocytochrome b2-based enzymatic composition, method and kit for L-lactate	Гончар М.В, Смуток О.В., Осьмак Г.С.	виключні майнові права
№45283, Україна	Спосіб кількісного визначення вмісту L-лактату у продуктах харчування та біологічних рідинах	Гончар М.В.,Смуток О.В., Осьмак Г.С.	виключні майнові права
№106834, Україна	Амперометричний хемосенсор для аналізу формальдегіду	Гончар М., Демків О., Смуток О., Гайда Г.	виключні майнові права
№10752, Україна	Спосіб кількісного визначення перекису водню та субстратів оксидаз у біологічних об'єктах	Майдан М.М., Сибірний А.А., Гончар М.В.	виключні майнові права

20. Фінансові аспекти роботи

20.1. Загальна вартість роботи 1250,000 тис. грн.

словами: один мільйон двісті п'ятдесят тисяч грн.

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2020 р.	2021 р.	2022 р.	2023 р.	2024 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	250,000	250,000	250,000	250,000	250,000

21. Наукові ради (комітети, комісії) НАН України, ради регіональних наукових центрів НАН і МОН України, яких доцільно залучити до експертної оцінки запиту

Наукова рада з проблем „Біохімія” та „Біотехнологія”.

22. Кандидатури можливих експертів у галузі, до якої відноситься робота, що пропонується

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Дробот Людмила Борисівна	д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Дзядевич Сергій Вікторович	д.б.н., проф., заступник директора з наукової роботи	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Борецький Юрій Романович	д.б.н., с.н.с., завідувач кафедри	Львівський державний університет фізичної культури, кафедра біохімії та гігієни м. Львів, вул. Костошка, 11, 79007

23. Додатки, що є невід'ємною частиною запиту:

1. Технічне завдання на виконання роботи (Додаток А).
2. Планова калькуляція кошторисної вартості роботи (Додаток Б).

дата

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

А.А. Сибірний

(підпис)

М.П.

Науковий керівник роботи

Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., проф.

М.В. Гончар

(підпис)

*Додаток А
до Запиту на відкриття наукової
(науково-технічної) роботи*

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ А.А. Сибірний
(підпис)

« _____ » _____ 20__ р.
М.П.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Уповноважена особа НАН України

_____ (підпис)

« _____ » _____ 20__ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ

на виконання наукової (науково-технічної) роботи

«Нанозими: синтез, характеристика та створення на їх основі нових нанокompозитних матеріалів із каталітичною активністю для медицини»

Цільова програма фундаментальних досліджень НАН України «Перспективні фундаментальні дослідження та інноваційні розробки наноматеріалів і нанотехнологій для потреб промисловості, охорони здоров'я та сільського господарства» на 2020–2024 рр.

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження роботи

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Фундаментальні наукові дослідження з найбільш важливих проблем розвитку науково-технічного, соціально-економічного, суспільно-політичного, людського потенціалу для забезпечення конкурентоспроможності України у світі та сталого розвитку суспільства і держави

3. Пріоритетний тематичний напрям наукових досліджень і науково-технічних розробок

Фундаментальні проблеми наук про життя та розвиток біотехнологій

4. Код та назва наукового напрямку або проблеми з Основних наукових напрямів та найважливіших проблем фундаментальних досліджень у галузі природничих, технічних і гуманітарних наук (для фундаментальних досліджень)

2.2.5.2. Розроблення нових біотехнологічних процесів на основі мікроорганізмів

5. Основний напрям наукової діяльності установи, за яким проводяться роботи

Вивчення молекулярно-генетичних і біохімічних механізмів регуляції метаболізму у дріжджів та створення нових біотехнологічних процесів і продуктів на основі цих мікроорганізмів.

6. Мета роботи

Пропонований проєкт ставить за мету синтез, вивчення структурних і каталітичних властивостей нових біологічно активних матеріалів, а саме, нанозимів; створення на їх основі нових діагностичних методів та вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні клітини (дріжджі та культури клітин людини). Створення нових наноматеріалів з каталітичними властивостями (нанооксидаз та нанопероксидаз) дозволить розробити нові методи високоселективної детекції низки практично важливих речовин для клінічної діагностики, а також, в разі біосумісності нанокомпозитних матеріалів, використати їх у ролі лікувальних засобів.

7. Термін проведення роботи:

початок — 01 квітня 2020 р. ; закінчення — 31 грудня 2024 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **1250,000** тис. грн.

та по роках

2020 р. — 250,000 тис. грн.

2021 р. — 250,000 тис. грн.

2022 р. — 250,000 тис. грн.

2023 р. — 250,000 тис. грн.

2024 р. — 250,000 тис. грн.

8. Календарний план роботи

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Скринінг та синтез нових наноматеріалів із оксидоредуктазною активністю	01 квітня 2020 р. - 31 грудня 2020 р.	к.х.н., с.н.с., Г.З. Гайда.
2	Структурно-функціональна характеристика нанозимів із оксидоредуктазною активністю	01 січня 2021 р. - 31 грудня 2021 р.	к.б.н., Т.М. Прокопів.
3	Імобілізація нанозимів на полімерних (у т.ч. біосумісних) носіях та дослідження каталітичних властивостей і стабільності нанозимів у розчині та в іммобілізованому стані Імобілізація нанозимів на полімерних, у т.ч. біосумісних носіях.	01 січня 2022 р. - 31 грудня 2022 р.	д.б.н., с.д., О.В. Смуток.
4	Створення нових діагностичних методів на основі нанозимів	01 січня 2023 р. - 31 грудня 2023 р.	к.б.н., А.Є. Закальський.
5	Вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні організми	01 січня 2024 р. - 31 грудня 2024 р.	к.б.н., О.М. Демків.

9. Зміст, основні вимоги до виконання роботи, рівня і способів її виконання

Планується провести скринінг та синтез нових наноматеріалів із оксидоредуктазною активністю; здійснити структурно-функціональну характеристику нанозимів із оксидоредуктазною активністю; іммобілізувати нанозими на полімерних, у т.ч. біосумісних носіях, дослідити каталітичні властивості та стабільність одержаних нанокompозитів; створити нові діагностичні методи на основі нанозимів; вивчити біологічну дію нанозимних композитів на еукаріотичні організми. Кінцевими продуктами даного проекту будуть нові біологічно активні наноматеріали – штучні ензими, нові методи клінічної діагностики на їх основі, нові перспективні біосумісні біологічно активні нанокompозитні матеріали для адресної доставки ліків в організм. Крім цього, буде зроблено внесок в розвіток фундаментальної науки про життя – буде поглиблено знання стосовно механізмів взаємодії каталітично активних наноматеріалів із живою клітиною. Соціально-економічна значимість результатів планованої роботи полягає у потребі заміни природних ферментів недорогими штучними каталізаторами, зокрема, нанозимами, в складі як біоаналітичних наборів, так і потенційних лікувальних засобів нового типу.

Очікуваний результат проекту виходить за рамки існуючого рівня технологій, тому внаслідок виконання проекту будуть одержані інноваційні результати.

Окрім того, завдяки залученню для проведення більшості наукових досліджень студентів та молодих вчених, запропонований проект має значний соціально-виховний вплив і створює сприятливі умов для набуття молоддю важливого наукового-практичного досвіду та кар'єрного росту.

10. Наукові (науково-технічні) результати, що очікуються за основними етапами та роботою в цілому

При виконанні проекту буде одержано наступні результати за основними етапами:

Етап 1. **"Скринінг та синтез нових наноматеріалів із оксидоредуктажною активністю"** (2020 р.).

Буде проведено скринінг синтезованих у попередніх дослідженнях нанокompatитних матеріалів на наявність каталітичної активності оксидоредуктаз (пероксидази, оксидази, каталази, супероксиддисмутази, лаккази). Буде одержано нові наночастинки (НЧ) благородних, перехідних та рідкісних металів, у тому числі їх гібридні форми методами хімічного відновлення відповідних солей та "зеленого" синтезу. Будуть синтезовані різноманітні наноматеріали на основі фероціанідних солей заліза (Пруська блакить), а також на базі аналогічних солей міді і кобальту. Будуть отримані похідні геміну та флавінів, іммобілізовані на поверхні нанокompatитних матеріалів. Після первинного скринінгу на відповідну псевдоензиматичну активність, каталітично активні наноматеріали (нанозими) буде відібрано для подальших досліджень.

Етап 2. **"Структурно-функціональна характеристика нанозимів із оксидоредуктажною активністю"** (2021 р.).

Буде проведено структурну характеристику нанозимів (НЗ) за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, флуоресцентної мікроскопії, атомно-силової спектроскопії, рентгено-спектрального аналізу та *динамічного світлорозсіювання*. Буде здійснено функціональну характеристику одержаних штучних ензимів (НЗ), а саме, буде докладно вивчено їхню субстратну специфічність та каталітичні властивості у порівнянні із природними прототипами. Буде вивчено стабільність НЗ у водних розчинах та оптимізовано методи їх зберігання/стабілізації у розчинах, близьких до фізіологічних. Буде відібрано для подальших досліджень НЗ, які можуть слугувати штучними заміниками практично важливих ферментів – пероксидази, каталази, супероксиддисмутази, лаккази, глюкозооксидази, алкогольоксидази або флавоцитохромом b_2 .

Етап 3. **"Іммобілізація нанозимів на полімерних (у т.ч. біосумісних) носіях та дослідження каталітичних властивостей і стабільності нанозимів у розчині та в іммобілізованому стані"** (2022 р.).

Буде опрацьовано способи та умови іммобілізації НЗ, які було відібрано на 2-му етапі, на різних полімерних носіях (фізична сорбція та ковалентні методи). В якості носіїв НЗ буде досліджено похідні карбонізованої целюлози, поліетиленімін, поліетиленгліколь, поліамідоамін, полі-L-лізин та інші, а також біосумісні носії циклодекстрин і хітозан. Головними критеріями відбору оптимального носія слугуватимуть наступні характеристики: розчинність у водних середовищах; нетоксичність; здатність до біодеградації; збереження/підвищення питомої каталітичної активності кінцевих продуктів «НЗ-носій»; забезпечення стабільності колоїдного стану сполук «НЗ-носій», тобто запобігання їх агрегації. Методом *динамічного світлорозсіювання* буде контролюватись розміри одержаних матеріалів «НЗ-носій» за їх дзета-потенціалами, у порівнянні з параметрами відповідних вихідних НЗ. Буде здійснено функціональну характеристику НЗ, зв'язаних з полімерними носіями («НЗ-носій»), зокрема, буде докладно вивчено їхню субстратну специфічність та каталітичні властивості у порівнянні з вихідними НЗ.

Етап 4. **"Створення нових діагностичних методів на основі нанозимів"** (2023 р.).

Дослідження будуть націлені на розробку методів високоселективної детекції низки практично важливих речовин для клінічної діагностики та фармакології. За використання найбільш ефективних нанозимів – міметиків алкогольоксидази, глюкозооксидази, флавоцитохрому b_2 , лаккази буде створено нові спектрофотометричні (та/або флуоресцентні) методи аналізу біологічних рідин людини (на вміст етанолу, метанолу, формальдегіду, глюкози, L-лактату) та деяких фармацевтичних препаратів (на вміст фенольних похідних, зокрема, деяких вітамінів та антиоксидантів). За використання найбільш ефективних міметиків пероксидази та комерційної глюкозооксидази (як моделі нанооксидази) буде створено та апробовано на реальних зразках спектрофотометричні методи аналізу глюкози.

Етап 5. **"Вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні організми"**(2024 р.).

Вивчення біологічної дії НЗ буде проводитись на 2-х моделях еукаріотичних організмів: на клітинах дріжджів та культурах псевдонормальних клітин людини *in vitro*. Буде вивчатись можлива токсичність нанозимних композитів (за впливом на швидкість росту клітин) та ефективність їх поглинання клітинами (за допомогою спектральних методів), а також локалізація (сканувальна електронна мікроскопія) і каталітична активність НЗ в клітинах. За умови успішного синтезу НЗ із оксидазною активністю, будуть проведені дослідження індукції утворення пероксиду водню за умов інкубації композитів «НЗ-носій» з відповідним субстратом нанооксидази. Позитивний тест дасть можливість рекомендувати такі нанокompозити як стерилізуючі агенти (за рахунок бактероцидної дії продукованого в ході реакції пероксиду водню).

У разі створення штучної каталази та супероксиддисмутази, а також, за умови біосумісності композитів «НЗ-носій», будуть створені фундаментальні основи нового типу ензимотерапії ("наноензимотерапії") деяких захворювань, що супроводжуються нагромадженням в клітинах реактивних форм кисню (пероксиду водню, супероксиданіон-радикалу).

Кінцевими продуктами даного проєкту будуть нові біологічно активні наноматеріали – штучні ензими; нові методи клінічної діагностики на їх основі; нові перспективні біосумісні біологічно активні нанокompозитні матеріали із каталітичною активністю як потенційні лікувальні препарати. Крім цього, буде зроблено внесок в розвиток фундаментальної науки про життя – буде поглиблено знання стосовно механізмів дії нанозимів та механізмів взаємодії каталітично активних наноматеріалів із живою клітиною.

Одержані наукові результати буде висвітлено у наукових публікаціях у міжнародних виданнях із високим індексом цитувань і виступах на міжнародних конференціях, а також буде використано для підготовки та подачі міжнародних та вітчизняних проєктів. Найбільш інноваційні результати будуть використані для подання заявок на патент.

11. Перелік науково-технічної та іншої документації, що надається по завершенню роботи

Звіт про НДР, публікації в фахових міжнародних журналах із високим індексом цитувань, розділи книг в англійських виданнях, публікації в українських виданнях, тези міжнародних конференцій, патент на корисну модель.

Науковий керівник роботи

Завідувач відділу

Інституту біології клітини НАН України

д.б.н., проф.

М.В. Гончар

(підпис)

Додаток Б
до Запиту на відкриття наукової
(науково-технічної) роботи

Планова калькуляція кошторисної вартості наукової (науково-технічної) роботи

**«Нанозими: синтез, характеристика та створення на їх основі нових нанокompозитних матеріалів із каталітичною активністю для медицини»
на 2020 рік**

Термін виконання роботи: початок — 01.04.2020 р., закінчення — 31.12.2024 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	125,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	27,500
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	15,000
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	5,000
5	Видатки на відрядження	2250	2,500
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	10,000
7	Оплата електроенергії	2273	43,000
8	Оплата природного газу	2274	22,000
Разом:			250,000
в т.ч. накладні витрати			23,125
% їх до основної заробітної плати			20,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ А.А. Сибірний
(підпис)
М.П.

Науковий керівник роботи
Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., проф.

_____ М.В. Гончар
(підпис)

Головний бухгалтер

_____ М.С. Демкович
(підпис)