

ЗАТВЕРДЖУЮ
Керівник підприємства/установи/організації
(Грантоотримувача)

(посада)
Директор Інституту біології клітини НАН України,
академік НАН України Сибірний А.А.



25955758

(підпис)

М.П.

АНОТОВАНИЙ ЗВІТ

про виконану роботу у 2021 році в рамках реалізації проєкту
із виконання наукових досліджень і розробок

«Створення нових нанозимів як каталітичних елементів для ензиматичних наборів та хемо/біосенсорів»
(назва Проєкту)

Назва конкурсу: Підтримка досліджень провідних та молодих учених _____
Реєстраційний номер Проєкту: 2020.02/0100

Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок (реєстраційний номер та назва Проєкту): 2020.02/0100 «Створення нових нанозимів як каталітичних елементів для ензиматичних наборів та хемо/біосенсорів»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу "Підтримка досліджень провідних та молодих учених" (назва конкурсу) протокол від "04-07" вересня 2020 року № 20.

1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2022 рік

Тривалість виконання Проєкту у 2021 р.

Початок – 14 травня 2021 р. (дата укладання Договору про виконання наукових досліджень і розробок);

Закінчення – 15 грудня 2021 р.

Загальна вартість Проєкту, грн.: 11 244 700 грн.

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 1 500 000 грн. _____

2-й рік 4 744 700 грн. _____

3-й рік 5 000 000 грн. _____

2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту залучено 6 виконавців, з них:

доктори наук 1;

кандидати наук 3;

інші працівники 2.

3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(Ї) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ

Виконавець проєкту – відділ аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України.

Субвиконавець проєкту – лабораторія матеріалів твердотільної мікроелектроніки і кафедра біології та хімії Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка.

4. ОПИС ПРОЄКТУ

4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Синтез, вивчення структурних, фізико-хімічних і каталітичних властивостей нових каталітично активних наноматеріалів (нанозимів) та створення на їх основі нових діагностичних методів та вивчення їх біологічної дії.

4.2. Основні завдання реалізації Проєкту в 2021 р. (до 400 знаків)

- Характеристика нанокомпозитів на основі оксиду Феруму;
- відбір нанозимів (НЗ) як заміників пероксидази або глюкозооксидази (ГО);
- функціональна характеристика НЗ, зв'язаних з полімерами;
- вивчення стабільності НЗ та оптимізація умов їх зберігання;
- вивчення токсичності, локалізації і каталітичної активності НЗ в клітинах *Ogataea polymorpha* C-105;
- створення нових ензимо-нанозимних методів аналізу глюкози за використання найактивніших НЗ і ГО.

4.3. Детальний зміст Проєкту:

Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Нанозими із пероксидазною активністю мають значний потенціал для різноманітного використання, а саме, в клінічній діагностиці для визначення вмісту різних метаболітів, імунологічних тестах, в біореакторах для знешкодження забруднювачів навколишнього середовища та для обробки стічних вод, як каталітичний елемент в біопаливних комірках для генерування електричної енергії.

Новизна Проєкту (до 400 знаків)

Плановане дослідження об'єднує кілька суміжних дисциплін (ензимологію, біотехнологію, нанотехнологію, хімію матеріалів, мікробіологію, аналітичну хімію) і спрямоване на одержання нових нанокомпозитних матеріалів із каталітичною активністю та дослідження можливості їхнього використання для розробки нових простих та недорогих біотехнологічних продуктів для аналізу низки важливих фізіологічних маркерів людини та компонентів харчових продуктів.

Методологія дослідження (до 400 знаків)

Імобілізація наноматеріалів і природних ферментів на поверхні наноносіїв. Кінетичний аналіз нанозимної активності. Дослідження структури та морфологічних особливостей сформованих нанокомпозитних матеріалів за використання мікроскопічних та спектральних методів. Дослідження біологічної та цитотоксичної дії синтезованих нанозимів на виживання еукаріотичних клітин неконвенційних дріжджів. Створення ензимо-нанозимного методу аналізу глюкози.

5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації 1 та 2 етапу Проєкту в 2021 р., зокрема:

5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання 1 етапу та 2 етапу Проєкту у 2021 р. (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)

Проведено скринінг та синтез нових нанозимів (НЗ), поєднуючи хімічне відновлення неорганічних солей перехідних або благородних металів аскорбіновою кислотою з новим методом осадження НЗ на металеві пластинки (позначені як НЗ^{III}).

Здійснено структурну характеристику отриманих НЗ за використання методів сканувальної електронної, флуоресцентної, атомно-силової мікроскопії; рентгено-спектрального аналізу та динамічного світлорозсіювання. Встановлено, що розмір отриманих матеріалів знаходиться в межах від 15 нм (НЗ) до 5 мкм (мікрозими, МЗ).

Аналіз синтезованих наноматеріалів на псевдоензиматичну активність (пероксидазну, каталазну, глутатіонпероксидазну, селенітрeredуктазну та глутатіонредуктазну) показав, що серед

отриманих 25 різних за хімічним складом НЧ, 4 володіють високою пероксидазною (7 – 10,6 Од./мг), 2 – редуказною (14,3 – 32,7 Од./мг), 2 – каталазною (0,2 – 0,3 Од./мг), по одному типу – глутатіонпероксидазною (0,14 Од./мг) та глутатіонредуктазною (0,61 Од./мг) активностями.

Досліджено каталітичні властивості та субстратну специфічність отриманих НЗ. Встановлено, що найвищою пероксидазною активністю серед синтезованих НЗ володіють $\text{Cu/Ce/Au}^{\text{III}}$ та Cu^{III} . Визначено кінетичні параметри (K_M і k_{cat}) для отриманих "голих" НЗ і МЗ та їх модифікованих полімерами форм. У пероксидазних реакціях, більшість синтезованих НЗ, зокрема, $\text{Cu/Ce/Au}^{\text{III}}$, Cu^{III} , Pt/Cu та Pd/Ce виявляють найвищу активність стосовно *o*-діанізидину.

Проведено скринінг монометалевих (Cd , Ce), біметалевих (Cd/Cu , Ce/Pd , Pt/Cu , Ce/Cu , Pd/Cd , Pd/Cu) та триметалевих ($\text{Cu/Cd/Zn}^{\text{II}}$) наночастинок (НЧ) на редуказну активність. Встановлено, що найвищу редуказну, зокрема, селенітредуказну активність, виявляють НЗ складу $\text{Cu/Cd/Zn}^{\text{II}}$ та $\text{Ce/Cu}^{\text{III}}$. Отримані НЗ $\text{Cu/Cd/Zn}^{\text{II}}$ протестовано на антиоксидантну активність відносно вільних радикалів АБТС^{•+} та DPPH[•] у порівнянні із Тролоксом: значення напівмаксимального інгібування (IC_{50}) для НЗ $\text{Cu/Cd/Zn}^{\text{II}}$ становить $6,8 \pm 0,2$ мкг/мл, що близько до Тролоксу ($2,70 \pm 0,1$ мкг/мл).

Отримано нові полімерні наноконкомпозити на основі магнітних НЧ оксиду Феруму Fe_3O_4 з іммобілізованою нанопероксидазою, глюкозооксидазою та кальцій альгінату. Встановлено, що інкапсуляція НЗ суттєво підвищує пероксидазо-подібну активність отриманих кульок. Для отриманих НЗ Cu^{III} , інкапсульованих в альгінатні кульки, спостерігається явище «циклічної реакції» окислення-відновлення.

Проведено ковалентну модифікацію металевих НЗ, що містять Аурум, посиданням цистеаміну, глутарового альдегіду та поліетиленіміну. Для отриманих функціоналізованих НЗ досліджено кінетичні характеристики, зокрема величини K_M , V_{max} , k_{cat} та субстратну специфічність. Показано, що функціоналізація НЗ полімерними носіями дозволяє модулювати каталітичні параметри НЗ, дещо змінювати субстратну специфічність та підвищувати їхню стабільність.

Проведено скринінг 23 типів гексаціанофератних (НСФ) НЧ - аналогів Пруської блакиті на основі перехідних металів, які володіють оксидоредуказною активністю. З них чотири типи НЗ (Au-НСФ , Pt-НСФ , Pd-НСФ , Ag-НСФ) виявляють вищу пероксидазну активність (від 1,68 до 6,7 Од./мг), п'ять типів НЗ (Cu-НСФ , Co-НСФ , Ni-НСФ , Mn-НСФ та Zn-НСФ) мають лакказну активність, шість НЗ (Fe/Ni-НСФ , Cu/Co-НСФ , Cu/Ni-НСФ , Ni-НСФ , Mn-НСФ та Zn-НСФ Cu-НСФ-K_4) - каталазну активність та чотири типи НЗ (Cu-НСФ-K_4 , Cu/Co-НСФ , Cu/Ni-НСФ та Au/Cu/Ce-НСФ) виявляють невисоку редуказну активність.

Здійснено структурно-морфологічну характеристику отриманих НСФ НЗ за допомогою сканувальної електронної мікроскопії, чим підтверджено різну форму НЗ (еліпсоподібну, кубічну та «наноквіткову») та відмінність у їхніх розмірах (від 50 нм до 5 мкм). За допомогою рентгено-спектрального аналізу підтверджено відповідний хімічний склад синтезованих НЧ (наявність певних перехідних та благородних металів).

Для синтезованих НЗ на основі НСФ досліджено каталітичні параметри у пероксидазних реакціях. Показано, що для трьох нанозимів (Pt-НСФ , Pd-НСФ та Pt/Ce-НСФ) значення K_M для H_2O_2 становить 3,4; 3,08 та 4,17 мМ, відповідно, що дуже близько до відповідного параметра пероксидази хрону. Для НЗ Cu/Fe-НСФ та Ag-НСФ значення K_M (відносно H_2O_2) є дуже близьким до CuO -нанолистків і становить: 16,6 та 16,68 мМ. Значення K_M для НЗ Au-НСФ є найнижчим (0,50 мМ), що свідчить про найбільшу спорідненість до H_2O_2 цього НЗ. Найбільш каталітично ефективними є НЗ Pd-НСФ , Ag-НСФ та Pt/Ce-НСФ , оскільки мають найвищі значення параметрів k_{cat} та k_{cat}/K_M . Усі досліджувані НЗ здатні ефективно окислювати у пероксидазних реакціях три субстрати: *o*-діанізидин, тетраметилбензидин (ТМБ) та 4-аміноантипірин (ААП).

Для підвищення стійкості гексаціанофератних НЗ у колоїдних розчинах, було протестовано вплив полімерних додатків: поліетиленіміну, поліетиленгліколю, полі-L-лізину, бета-циклодекстрину, Твіну-80, полівінілпіролідону-90. Показано, що підвищення стабільності колоїдного стану спостерігається для комплексів « $\text{Cu/Fe-НСФ-полі-L-лізин}$ » та « $\text{Au-НСФ-полівінілпіролідон-90}$ », тобто, полі-L-лізин та полівінілпіролідон-90 запобігають агрегації НЗ, що є цінним для практичного використання.

Встановлено, що модифікація НЗ Au-HCF, Cu/Fe-HCF та Pt-HCF полімерами підвищує пероксидазну активність (у 1,2-1,8 раза), хоча при цьому має місце зростання значення K_m (до H_2O_2) у порівнянні з «голими» НЗ, за винятком комплексу "Cu/Fe-HCF-Твін-80", для якого значення K_m знижується в 2,7 раза, що свідчить про кращу спорідненість до H_2O_2 . Показано, що усі модифіковані полімерами НЗ (Au-HCF-Твін-80, Au-HCF-поліетиленімін, Pt-HCF-Твін-80, Pt-HCF-поліпропіленгліколь, Cu/Fe-HCF-ПЕГ-6000 та Cu/Fe-HCF-Твін-80) здатні у присутності H_2O_2 окислювати різні органічні субстрати: *o*-діанізидин, АБТС, ТМБ та ААП.

Вивчено цитотоксичну дію на клітини дріжджів синтезованих НЗ за впливом на швидкість росту та виживання клітин за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Показано, що НЗ (у концентрації 0,1 мг/мл у середовищі) проявляють різний цитотоксичний вплив на клітини дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: «катазими» знижують виживання клітин в 2,6-4,5 раза, тоді як НЗ з пероксидазною активністю дещо підвищують цей показник.

Досліджено ефективність поглинання клітинами *O. polymorpha* НЗ та їх локалізацію всередині клітин. У збагачених нанозимами клітин, у порівнянні із контрольними, показано зростання ензиматичної активності, зокрема псевдо-редуктазна активність у присутності Cd/Cu НЗ підвищується у 10,7 раза, каталазна – у 1,9 раза (для Pt-НЧ), лакказна – у 15,6 раза (для Co/Cu/Ce НЧ) та пероксидазна – у 4,9 раза (для Au НCF), відповідно.

Встановлено, що поглинання безкаталазними клітинами «катазимів» відновлює здатність мутантних клітин рости на метанолі. Активність НЗ забезпечує розщеплення надмірної кількості Гідроген пероксиду, що утворюється внаслідок росту клітин на метанолі, усуваючи його токсичну дію на клітини. Вірогідно, це перший у світі експеримент доказу можливості заміни природного фермента нанозимом *in vivo*.

Створено новий ензимо-нанозимний метод аналізу глюкози за використання нанозимних міметиків пероксидази і природної глюкозооксидази. Опрацьовано методику аналізу сироватки крові людини та фруктових соків на вміст глюкози ензимо-нанозимним методом.

5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами

Опубліковано 11 статей в міжнародних журналах із сумарним імпаکت-фактором 38,733 (8 - експериментальних і 3 - оглядових).

1. Demkiv O., Stasyuk N., Serkiz R., Gayda G., Nisnevitch, M., Gonchar M. Peroxidase-Like Metal-Based Nanozymes: Synthesis, Catalytic Properties, and Analytical Application // *Appl. Sci.* 2021. Vol. 11. P. 777. <https://doi.org/10.3390/app11020777>. (IF = 2.679). Q2.
2. Gayda G.Z., Demkiv, O.M., Gurianov Y., Serkiz R.Y., Klepach H.M., Gonchar M.V., Nisnevitch M. "Green" Prussian Blue Analogues as Peroxidase Mimetics for Amperometric Sensing and Biosensing // *Biosensors.* 2021. Vol. 11. P. 193. <https://doi.org/10.3390/bios11060193>. (IF = 5.519). Q1.
3. Stasyuk N., Gayda G., Demkiv O., Darmohray L., Gonchar M., Nisnevitch M. Amperometric Biosensors for L-Arginine Determination Based on L-Arginine Oxidase and Peroxidase-Like Nanozymes // *Appl. Sci.* 2021. Vol. 11. P. 7024. <https://doi.org/10.3390/app11157024>. (IF = 2.679). Q2.
4. Smutok O., Kavetskyu T., Prokopiv T., Serkiz R., Wojnarowska-Nowak R., Šauša O., Novák I., Berek D., Melman A., Gonchar M. New micro/nanocomposite with peroxidase-like activity in construction of oxidases-based amperometric biosensors for ethanol and glucose analysis // *Anal. Chim. Acta.* 2021. Vol. 1143. P. 201. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.052>. (IF = 6.558). Q1.
5. Smutok O., Kavetskyu T., Gonchar M., Katz E. Microbial L- and D-Lactate Selective Oxidoreductases as a Very Prospective but Still Uncommon Tool in Commercial Biosensors // *ChemElectroChem.* 2021. Vol. 8, P. 1-8. <https://doi.org/10.1002/celec.202101149>. (IF = 4.590). Q1.
6. Smutok O., Dmytruk K., Kavetskyu T., Sibirny A., Gonchar M. Flavocytochrome b_2 of the Methylophilic Yeast *Ogataea polymorpha*: Construction of Overproducers, Purification, and Bioanalytical Application // *Methods Mol. Biol.* In Book: Flavins and Flavoproteins. – 2021. – 2280. – P. 249-260. ISSN 1064-3745; and 1940-6029 (el. version); ISBN 978-1-0716-1286-6 (eBook). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_16.
7. Klepach H.M., Zakalskiy A.E., Zakalska O.M., Gayda G.Z., Smutok O.V., Gonchar M.V. Alcohol Oxidase from the Methylophilic Yeast *Ogataea polymorpha*: Isolation, Purification, and

Bioanalytical Application // Methods Mol. Biol. In Book: Flavins and Flavoproteins. – 2021. – 2280. – P. 231-248. ISSN 1064-3745 and 1940-6029 (el. version); ISBN 978-1-0716-1286-6 (eBook). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_15.

8. Kavetsky T., Boev V., Ilcheva V., Kukhazh Y., Smutok O., Pan'kiv L., Šauša O., Švajdlenková H., Tatchev D., Avdeev G., Gericke E., Hoell A., Rostammia S., Petkova T. Structural and free volume characterization of sol-gel organic-inorganic hybrids, obtained by co-condensation of two ureasilicate stoichiometric precursors // *J. Appl. Polym. Sci.* 2021. Vol. 138. P.e50615(1-10). <https://doi.org/10.1002/app.50615> (IF = 2.520). Q1.

9. Eftekhari A., Arjmand A., Asheghvatan A., Švajdlenková H., Šauša O., Abiyev H., Ahmadian E., Smutok O., Khalilov R., Kavetsky T., Cucchiari M. The potential application of magnetic nanoparticles for liver fibrosis theranostics // *Front. Chem.* 2021. Vol. 9, P. 674-786. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.674786>. (IF = 5.221). Q1.

10. Kavetsky T., Alipour M., Smutok O., Mushynska O., Kiv A., Fink D., Farshchi F., Ahmadian E., Hasanzadeh M. Magneto-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in biomedical analysis // *Microchem. J.* 2021. Vol. 167, P. 106320 (1-13). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106320>. (IF = 4.821). Q2.

11. Demkiv O, Stasyuk N, Gayda G, Gonchar M. Highly Sensitive Amperometric Sensor Based on Laccase-Mimicking Metal-Based Hybrid Nanozymes for Adrenaline Analysis in Pharmaceuticals // *Catalysts.* 2021. Vol. 11 (12). P. 1510. <https://doi.org/10.3390/catal11121510>. (IF = 4.146). Q2.

5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту у 2021 р. для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)

Кінцевими продуктами даного проєкту будуть нові біологічно активні наноматеріали – штучні ензими. Буде створено лабораторний прототип ензимо-нанозимного набору для аналізу глюкози із спектрофотометричною детекцією продукту реакції.

5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.

На основі проведених досліджень буде підготовлено низку методичних напрацювань по способах та умовах іммобілізації нанозимів, на різних носіях (фізична сорбція та ковалентні методи). В якості носіїв НЗ буде досліджено похідні поліетиленіміну, поліетиленгліколю, циклодекстрину, хітозану та ін. Отримані методичні напрацювання будуть рекомендовані для використання у навчальному процесі – при викладанні дисциплін вільного вибору «Хемо- та біосенсорика» і «Молекулярно організовані структури на твердій поверхні» для студентів хімічного, біологічного факультету ЛНУ ім. І. Франка. Створені лабораторні прототипи ензимо-нанозимного набору для аналізу глюкози із спектрофотометричною детекцією можуть використовуватись у клінічній практиці.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

Науковий керівник Проєкту

завідувач відділу аналітичної біотехнології

Інституту біології клітини НАН України

(посада)

Гончар Михайло Васильович

ПІБ



(підпис)