

**ПРОЄКТНА ПРОПОЗИЦІЯ НА УЧАСТЬ У КОНКУРСІ
СПІЛЬНИХ УКРАЇНСЬКО – ЧЕСЬКИХ НАУКОВО-
ДОСЛІДНИХ ПРОЄКТІВ ДЛЯ РЕАЛІЗАЦІЇ У 2021 – 2022 рр.**

**APPLICATION FORM FOR PARTICIPATION IN THE CALL OF
THE JOINT UKRAINIAN-CZECH R&D PROJECTS
FOR THE PERIOD OF 2021 – 2022**

Загальна інформація / General Information

Назва проєкту українською мовою / Title of the project in Ukrainian:	Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту креатиніну – біомаркера функціонального стану нирок та ефективності гемодіалізу
Назва проєкту англійською мовою / Title of the project in English:	Development of new bioanalytical methods for analysis of creatinine – a biomarker of renal functional status and hemodialysis efficiency
Анотація (макс. 1000 символів) / Summary (max 1000 characters)	<p>Пошук біомаркерів найпоширеніших захворювань та індикаторів для оцінки перебігу та лікування хвороб – пріоритетні напрямки світової науки в галузі аналітичної біотехнології. Серед таких біомаркерів важлива роль належить метаболітам, зокрема, креатиніну – одному із кінцевих продуктів обміну білків в організмі людини. Розробка нових біоаналітичних технологій стане науковою основою для створення практично важливих аналітичних продуктів (ензиматичний набір та лабораторний прототип біосенсора для аналізу креатиніну), що дозволить покращити діагностику порушень функції нирок та вдосконалить моніторинг перебігу ниркових захворювань, оцінку ефективності гемодіалізу та лікування. Ці розробки можуть використовуватись в клінічних лабораторіях, центрах гемодіалізу та науково-дослідних установах медичного профілю, а також центрах спортивної медицини.</p> <p>The search for biomarkers of the most common diseases and indicators to assess the course and treatment of diseases are priority areas of world science in the field of analytical biotechnology. Among such biomarkers, metabolites, in particular, creatinine, one of the final products of protein metabolism in humans, play an important role. The development of new bioanalytical technologies will be the scientific basis for the creation of practically important analytical products (enzymatic kit and laboratory prototype biosensor for the analysis of creatinine), which will improve the diagnosis of kidney dysfunction and will be helpful for monitoring the course of kidney disease, evaluation of treatment efficiency, and hemodialysis. These developments could be widely used in clinical laboratories, hemodialysis centers, medical research institutes, and sports medicine centers.</p>
Відповідність пріоритетній галузі досліджень (відмітити хрестиком) / Conformity with the priority research area	<input type="checkbox"/> Інформаційні технології, включаючи нові ринкові технології / Information technology including new trade technology <input type="checkbox"/> Електроенергетика / Power engineering <input type="checkbox"/> Екологія та раціональне використання природних ресурсів / Ecology and the rational use of natural resources <input checked="" type="checkbox"/> Біотехнології, нові терапевтичні методи, профілактика захворювань / Biotechnology, new therapeutic methods,

<i>(mark with cross mark)</i>	prophylaxis of diseases <input checked="" type="checkbox"/> Нові речовини та матеріали / New substances and materials <input type="checkbox"/> Сучасне машинобудування / Contemporary specialization in engineering <input type="checkbox"/> Суспільні науки, гуманітарні науки, мистецтво / Social sciences, human sciences and arts
-------------------------------	--

Партнери / Partners

Український партнер (UA) / Ukrainian Partner (UA):	
Установа / Name	Інститут біології клітини, НАН України Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
Юридична адреса / Legal address	<i>Юридична адреса:</i> Україна, Львів, вул. Драгоманова, 14/16 <i>Legal address:</i> Drahomanov str., 14/16, Lviv, Ukraine
	<i>Поштовий індекс / Postcode:</i> 79005
	<i>E-mail:</i> institut@cellbiol.lviv.ua
	<i>Номер тел. / Phone:</i> +380 322 612144
Контактна інформація / Contact information	Науковий керівник / Principal investigator
	<i>ПІБ повністю, науковий ступінь:</i> Гончар Михайло Васильович, проф., к.х.н., д.б.н. <i>Scientific degree, name, surname:</i> Prof., DrSc Mykhailo Gonchar
	<i>Посада:</i> Зав. відділом аналітичної біотехнології <i>Position:</i> Head of the Department of Analytical Biotechnology
	<i>Номер тел. / Phone:</i> +380 322 612144
	<i>E-mail:</i> mykhailo1952@gmail.com ; gonchar@cellbiol.lviv.ua

Чеський партнер (CZ) / Czech partner (CZ):	
Установа / Name	Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno/Кафедра хімії та біохімії університету Менделя в Брно
Юридична адреса / Legal address	<i>Юридична адреса:</i> Чехія, Брно, вул. Земедельська 1 <i>Legal address:</i> Zemedelska str., 1, Brno, Czech Republic
	<i>Поштовий індекс / Postcode:</i> 613 00
	<i>E-mail:</i> chemie@mendelu.cz
	<i>Номер тел. / Phone:</i> +420 545 133 311
Контактна інформація / Contact information	<i>Саїт / Web site:</i> https://ucb.af.mendelu.cz
	Науковий керівник / Principal investigator
	<i>Науковий ступінь, ім'я, прізвище:</i> Лукас Ріхтера, к.т.н., д.х.н. <i>Scientific degree, name, surname:</i> RNDr., PhD Lukas Richtera
	<i>Посада:</i> Керівник науково-дослідної групи синтезу та хімічних аналізів <i>Position:</i> Leader of Research Group of Synthesis and Chemical Analysis
	<i>Номер тел. / Phone:</i> +420 545 133 311
<i>E-mail:</i> richtera@mendelu.cz	

1. Завдання проєкту (до 0,5 сторінки A4, 12pt) (тут і далі – обсяг для тексту українською мовою; обсяг тексту англійською мовою в залежності від перекладу) / Project objectives (up to half A4 size sheet, 12pt)

Мета проєкту полягає у розробці нових біоаналітичних методів для кількісного визначення вмісту креатиніну – метаболіту білкового обміну, важливого біомаркера функціонального стану нирок. Як аналітичний інструмент буде використано рекомбінантну форму стабільної мікробної креатиніндеїмінази (КДІ), продуцент якої створено авторами цього проєкту [Zakalskiy et al., 2020]. Робота включає такі основні етапи: 1) препаративне виділення та очищення рекомбінантної креатиніндеїмінази (КДІ) з клітин мікробного надпродуцента фермента; 2) розробка ензиматичного методу аналізу креатиніну за використання КДІ із спектрофотометричною та флуориметричною детекцією кінцевого продукту; 3) скринінг та синтез нових хемосенсорних матеріалів, чутливих до іонів амонію; 4) створення та характеристика нового амперометричного біосенсора для визначення вмісту креатиніну на основі використання рекомбінантної КДІ та хемосенсорної мембрани, чутливої до іонів амонію; 5) тестування створених ензиматичного та біосенсорного методів аналізу креатиніну на реальних клінічних зразках біологічних рідин людини.

The aim of the project is a development of new bioanalytical methods for quantitative analysis of creatinine - a metabolite of protein metabolism, an important biomarker of the functional state of the kidneys. As an analytical tool, the recombinant form of stable microbial creatinine deiminase (CDI) will be used, producer for which has been constructed by authors of the current project [Zakalskiy et al., 2020]. The work includes the following main stages: 1) preparative isolation and purification of recombinant creatinine deiminase (CDI) from cells of microbial overproducer of the enzyme; 2) development of CDI-based enzymatic method for the analysis of creatinine using spectrophotometric and fluorimetric detection of the final product; 3) screening and synthesis of new chemosensory materials sensitive to ammonium ions; 4) construction and characterization of a new amperometric biosensor for the determination of creatinine, based on the use of recombinant CDI and selected chemosensory membrane, sensitive to ammonium ions; 5) testing the created enzymatic and biosensor methods for analysis of creatinine on the real clinical samples of human biological fluids.

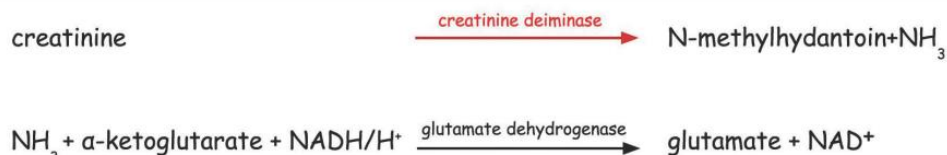
2. Опис поточної ситуації (до 2 сторінок A4, 12pt) / Description of the current situation (up to 2 A4 size sheets, 12pt)

Показник вмісту креатиніну в плазмі (сироватці) крові, завдяки своїй простоті й дешевизні, широко використовується в рутинній медичній практиці для визначення швидкості клубочкової фільтрації - інтегрального показника видільної функції нирок. Нормальний вміст креатиніну в крові складає: для жінок – 44-97 мкМ, для чоловіків - 62—115 мкМ. При функціонуванні тільки однієї нирки цей рівень підвищується до 159-168 мкМ. Підвищена понад норму концентрація креатиніну в сироватці крові (для дітей – понад 177 мкМ, для дорослих – понад 885 мкМ) свідчить про серйозну ниркову недостатність. Гіперкреатинінемія може бути пов'язана з хронічними або гострими нирковими захворюваннями та ураженням нирок токсичними чинниками, зокрема, медикаментами (рентгеноконтрастні засоби, антибіотики-аміноглікозиди, антибіотики-цефалоспорини, статини, тощо). Підвищення рівня креатиніну в сироватці крові спостерігається також при споживанні великої кількості м'яса (якщо, крім того, має місце підвищений вміст креатиніну в сечі). Рівень креатиніну підвищується також при зневодненні організму, ураженні м'язів. Зниження вмісту креатиніну спостерігається при недостатньому споживанні м'яса, вегетаріанському раціоні, голодуванні, а також в I та II триместрах вагітності. Креатинін розглядається як важливий показник фізіологічного стану спортсменів [Banfi, 2010], і є потреба у простих, неінвазійних методах аналізу цього метаболіту в біологічних рідинах, включаючи піт.

Для визначення вмісту креатиніну опрацьовано різні хімічні та фізико-хімічні методи [Narayanan and Appleton, 1980; Марченко і співавт., 2013], включаючи добре відому кольорову реакцію Яффе з утворенням комплексу Яновського з пікрат-аніоном [Jaffe,

1886], проте недоліками останнього методу (а також різних модифікацій) є низька специфічність та чутливість до позитивної і негативної інтерференції з боку супутніх речовин. Запропоновані фізико-хімічні методи потребують значних затрат часу, тривалої та складної підготовки проб, дорогих реактивів, висококваліфікованого персоналу і, найголовніше, не дають можливості аналізу в режимі реального часу.

Для ензиматичного аналізу креатиніну запропоновано супряження креатиніндеіміназної реакції, в якій утворюється аміак, із глутаматдегідрогеназною реакцією, в якій відбувається окислення NADH, що монітується спектрофотометрично при 340 нм [Gottschalk *et al.*, 2005]:



Інший підхід ґрунтується на використанні двох ферментів - креатинінази (КФ 3.5.2.10) та креатинази (КФ 3.5.3.3). Креатинін перетворюється креатиніназою в креатин, а креатин за дії креатинази – до сечовини і саркозину, який визначається колориметрично (при 570 нм) або флуориметрично (Ex/Em = 538/587 нм) за використання ще 2-х ферментів - саркозиноксидази та пероксидази. На цьому принципі побудовано ензиматичний набір для аналізу креатиніну, який випускається фірмою “SIGMA-ALDRICH” [<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak080bul.pdf>] (каталожна ціна – 342 Євро на 100 визначень), а також креатину [<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak079bul.pdf>] (ціна 360,5 Євро на 100 визначень). Аналогічний набір для аналізу креатиніну виробляє фірма BIOVISION [<http://www.biovision.com/creatinine-colorimetric-fluorometric-assay-kit-2919.html?osCsid=h0e9c76dgpo08ojioa6j4fp9j1>] (каталожна ціна – 285 доларів США на 100 визначень), а також фірма ABCAM [<http://www.abcam.com/ps/products/65/ab65340/documents/ab65340%20Creatinine%20Assay%20kit%20protocol%20v9%20%28website%29.pdf>] (за ціною 385 євро на 100 аналізів).

Великий інтерес викликає конструювання біосенсорів для аналізу креатиніну [Pundir *et al.*, 2019]. В літературі описано різні типи біосенсорів, які ґрунтуються, в основному, на застосуванні фермента КДІ (як біокаталітичного елемента), часто у поєднанні з іншими ферментами [Zakalskyi *et al.*, 2019]. Для перетворення сигналу використовуються пристрої різного типу – потенціометричні, амперометричні, кондуктометричні, імпедіометричні та оптичні. Українськими авторами [Марченко та співавт., 2013] описано лабораторні прототипи потенціометричного біосенсора на основі рН-чутливого транзистора, проте їх недоліком є негативний вплив на результати аналізу високої буферної ємності аналізованих зразків (сироватки або плазми корови).

Незважаючи на значну кількість наукових публікацій, проблема серійного випуску біосенсорів для аналізу креатиніну досі не розв’язана. Це пов’язано, перш за все, з нестабільністю КДІ та дороговизною більшості перетворювачів.

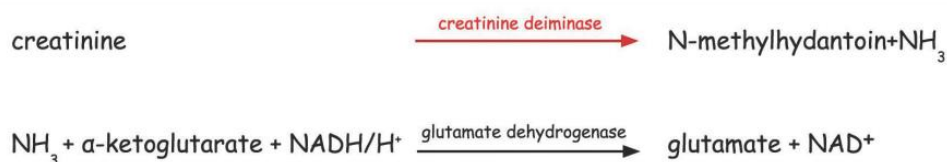
Отже, аналіз проблеми визначення вмісту креатиніну та йонів амонію в світовій літературі показує на подальшу актуальність проблеми, особливо в плані опрацювання високо-селективного недорогого ензиматичного методу аналізу цього аналіту або конструювання доступного біосенсора на основі стабільної КДІ, отримуваної із високопродуктивного мікробного рекомбінантного продуцента. Ці завдання є особливо актуальні для України, де практично не виготовляються власні аналоги.

The plasma (serum) content of creatinine, due to its simplicity and cheapness, is widely used in routine medical practice to determine the rate of glomerular filtration - an integral indicator of the excretory function of the kidneys. The normal content of creatinine in the blood is in the frames of: for women about 44-97 μM and 62-115 μM for men. With the functioning of only one kidney, this level increases to 159-168 μM . Elevated serum creatinine concentrations (above 177 μM for children and 885 μM for adults) indicate severe renal insufficiency. Hypercreatinemia can be associated with chronic or acute renal disease and renal toxicity,

including medications (X-ray contrast agents, antibiotics-aminoglycosides, antibiotics-cephalosporins, statins, etc.). Increased serum creatinine is also observed when consuming large amounts of meat (unless, in addition, there is an increased urinary creatinine content). Creatinine levels are also increased during dehydration, muscle damage. Decreased creatinine is observed in poor meat consumption, vegetarian diets, fasting, and in the I and II trimesters of pregnancy. Creatinine is regarded as an important indicator of the physiological state of athletes [Banfi, 2010], and there is a need for simple, non-invasive methods of analysis of this metabolite in biological fluids, including sweat.

Various chemical and physicochemical methods have been proposed to determine creatinine content [Narayanan and Appleton, 1980; Marchenko et al., 2013], including the well-known color Jaffa reaction with the formation of the Janowski complex with picrate anion [Jaffe, 1886], but the disadvantages of the latter method (as well as various modifications) are the low specificity and sensitivity to positive and negative interference from related substances. The proposed physicochemical methods require considerable time, long and complicated preparation of samples, expensive reagents, highly qualified personnel, and, most importantly, do not allow real-time analysis.

For enzymatic analysis of creatinine, conjugation of a creatinine deiminase reaction in which ammonia is formed with a glutamate dehydrogenase reaction in which NADH oxidation occurs, which is monitored spectrophotometrically at 340 nm, is proposed [Gottschalk et al., 2005]:



Another approach is based on the use of two enzymes - creatininase (CF 3.5.2.10) and creatinase (CF 3.5.3.3). Creatininase is converted by creatinase to creatine, and creatine, by the action of creatinase, to urea and sarcosine, which is determined colorimetrically (at 570 nm) or fluorimetrically (Ex / Em = 538/587 nm), using two additional enzymes, sarcosine oxidase and peroxidase. On this principle, an enzymatic kit for the analysis of creatinine is manufactured by SIGMA-ALDRICH [<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak080bul.pdf>] (catalog price - 342 Eur per 100 analyses) and creatine [<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak079bul.pdf>] (360.5 Eur per 100 analyses). A similar kit for creatinine is produced by BIOVISION [<http://www.biovision.com/creatinine-colorimetric-fluorometric-assay-kit-2919.html?osCsid=h0e9c76dgp08ojioa6j4fp9j1>] (the catalog price is 285 \$ per 100 analyses) also ABCAM [<http://www.abcam.com/ps/products/65/ab65340/documents/ab65340%20Creatinine%20Assay%20kit%20protocol%20v9%20%28website%29.pdf>] (priced at 385 Eur per 100 analyses).

Of great interest is the development of biosensors for the analysis of creatinine. The literature describes various types of biosensors based mainly on the use of the CDI enzyme (as a biocatalytic element), often in combination with other enzymes [Zakalskyi et al., 2019]. Various types of devices are used to convert the signal - potentiometric, amperometric, conductometric, impedimetric, and optical. The Ukrainian authors [Marchenko et al., 2013] described a laboratory prototype of a potentiometric biosensor based on a pH-sensitive transistor, but its disadvantage is the negative impact on the results of the analysis of high buffer capacity of the analyzed samples (serum or plasma).

Despite the considerable number of scientific publications, the problem of serial production of biosensors for creatinine analysis has not been solved yet. This is primarily due to the instability of the CDI and the high cost of the most known transducers.

Therefore, the problem of analysis of creatinine and ammonium ions in the world literature indicates the further actuality of the proposed research, especially in terms of working out a highly selective low-cost enzymatic method of analysis of this analyte or designing an available

biosensor based on stable microbial CDI. These tasks are especially relevant for Ukraine, where relevant analogs are not produced yet.

Література/References:

1. Banfi G. Serum creatinine concentrations in athletes: are they normal? // Brazilian Journal of Biometrics. – 2010. - V. 4, No 3. – P. 157-164.
2. Narayanan Sh. and Appleton H.O. Creatinine: A Review // Clin. Chem. - 1980. – V. 26, No 8. – P. 1119-1126.
3. Марченко С. В., Зінченко О. А., Поляков Л. С., Герешко А. М., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Біосенсор на основі креатиніндеїмінази та рН-чутливого польового транзистора для аналізу креатиніну в сироватці крові // Biotechnologia Acta. – 2013. - V. 6, No 5. – P. 79-86.
4. Jaffe M. Über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt, und über eine neue Reaktion des Kreatinins // Z. Physiol. Chem. –1886. - V. 10. — P. 391–400.
5. Gottschalk E-M., Gottschalk G., Delitz R-P., Holdt-Lehmann B., Thormann K., Schmitz-Streit R. (2005). A new creatinine assay destined to become routine. Renal Disease. // www.clin-online.com/fileadmin/artimg/a-new-creatinine-assay-destined-to-become-routine.pdf
6. Zakalskiy A., Stasyuk N., Gonchar M. Creatinine Deiminase: Characterization, Using in Enzymatic Creatinine Assay, and Production of the Enzyme. Current Protein & Peptide Science. 2019, 20(5):465-470. DOI: [10.2174/1389203720666181114111731](https://doi.org/10.2174/1389203720666181114111731)
7. Zakalskiy A., Stasyuk N., Zakalska O., Boretsky Y., Gonchar M. Overexpression and one-step renaturation-purification of the tagged creatinine deiminase of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* cells // Cell Biol. Intern. – 2020. - V. 44, No. 5. – P. 1204-1211. <https://doi.org/10.1002/cbin.11320>

3. Новизна проєкту (до 1 сторінки А4, 12pt) / Novelty of the project (up to 1 A4 size sheet, 12 pt)

Актуальність планованих досліджень пов'язана з потребою в розробці селективних, чутливих і водночас недорогих методів аналізу практично важливих аналітів – біомаркерів найбільш поширених захворювань. Соціально-економічна значимість результатів планованої роботи полягає у їх потребі в клінічній діагностиці ниркової дисфункції, для оцінки тяжкості захворювання, контролю його перебігу та лікування (у тому числі, методом гемодіалізу), а також у спортивній медицині (оцінка загального фізіологічного статусу організму спортсменів, особливо при ризиках порушення гідроелектролітичного балансу організму).

Даний проєкт ставить за мету опрацювання нових біоаналітичних методів для кількісного визначення креатиніну – метаболіту білкового обміну, важливого біомаркера функціонального стану нирок. Як аналітичний інструмент буде використано рекомбінантну форму стабільної креатиніндеїмінази (КДІ) мікробного походження – як у складі біосенсорного елемента, так в ролі біокаталітичного компонента ензиматичного аналітичного набору.

На сьогодні на ринку наявні ліофілізовані препарати КДІ мікробного походження виробництва фірм Sigma-Aldrich, Fisher Scientific, Sorachim, Toyobo Enzymes з питомою активністю від 10 до 25 Од./мг білка та ціною від 285 доларів США до 1985 Євро за 10 мг. Водночас, важливою проблемою використання комерційних препаратів КДІ в аналітичних цілях, окрім її дороговизни, є і недостатня специфічність цього фермента до креатиніну: різні бактерії та гриби продукують фермент, який, крім креатиніндеїміназної активності, виявляє побічну цитозиндеїміназну активність [Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000]. Як результат першого етапу запланованих досліджень, планується отримати селективний, високо очищений препарат рекомбінантної КДІ із питомою активністю, що перевищить більшість комерційних аналогів. Успішність запланованих досліджень зумовлена тим, що рекомбінантна КДІ із конструйованого нами раніше продуцента *Escherichia coli*, що несе надекспресований ген *codA Corynebacterium glutamicum* РСМ 1945 тагована (His)₆-фрагментом [Zakalskiy et al., 2020]. Модифікація фермента (His)₆-тагом спрощує процедуру його ефективного виділення та очистки на Ni-афінному сорбенті.

За використання рекомбінантної КДІ та селективних реагентів на іони амонію, буде створено ензиматичний набір для визначення креатиніну в біологічних рідинах людини із спектрофотометричною та/або флуориметричною детекцією продукту реакції. За рахунок використання дешевого джерела фермента та недорогих реагентів, запропонований ензиматичний набір буде в декілька разів дешевший відомих комерційних аналогів.

Створений на основі рекомбінантної КДІ та хемоселективних до іонів амонію нанокompозитних мембран амперометричний біосенсор спростить та пришвидшить аналіз креатиніну в зразках рідин людини. Також передбачається, що за його використання, у подальшому, стане можливим аналіз відповідного аналіту в реальному часі (on-line) для контролю ефективності перебігу процесу гемодіалізу.

The actuality of the planned research is related to the need to develop selective, sensitive, nonexpensive methods of analysis of practically important analytes, the biomarkers of the most common diseases. The social-economic significance of the planned work results is their need for clinical diagnosis of renal dysfunction, for the assessment of the severity of the disease, control of its course and treatment (including by the method of hemodialysis), as well as in sports medicine (assessment of the general physiological status of the body of athletes, especially at risks of disturbance of the hydro-electrolytic balance of an organism).

This project aims to develop new bioanalytical methods for the quantitative determination of creatinine, a metabolite of protein metabolism, an important biomarker of the functional state of the kidneys. The recombinant form of stable creatinine deiminase (CDI) from microbial sources will be used as an analytical tool, both as a biocatalytic component of the enzymatic analytical kit and a biorecognition element of the biosensor.

At present, it is available lyophilized microbial CDI preparations manufactured by Sigma-Aldrich, Fisher Scientific, Sorachim, Toyobo Enzymes, with a specific activity of 10 to 25 U/mg protein, are priced from \$ 285 to 1985 Euro for 10 mg. However, an important problem with the use of commercial CDI preparations for analytical purposes, in addition to its high cost, is the lack of specificity of this enzyme for creatinine: various bacteria and fungi produce an enzyme that, in addition to creatinine deiminase activity, detects cytosine deiminase [Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000]. As a result of the first phase of the proposed studies, it is planned to obtain a selective, highly purified preparation of recombinant CDI with a specific activity that will exceed most commercial analogs. The success of the planned studies is due to the fact that recombinant CDI from the previously produced *Escherichia coli* producer carrying the overexpressed *codA* gene *Corynebacterium glutamicum* PCM 1945 was tagged with (His)₆-fragment [Zakalskyi et al., 2020]. The modification of the enzyme by His₆-tag fragment simplifies the procedure for its efficient isolation and purification on Ni-affinity sorbent.

On the base of the recombinant CDI and selective reagents for ammonium ions, an enzymatic kit will be created to creatinine analysis in human biological fluids with spectrophotometric and/or fluorimetric detection of the reaction product. The proposed enzymatic kit will be several times cheaper than known commercial analogs due to the use of a cheap source of enzyme and inexpensive reagents.

Created on the base of recombinant CDI and chemoselective to ammonium nanocomposite membranes, the amperometric biosensor will simplify and accelerate the analysis of creatinine in human fluid samples. It is also envisaged that its use will, in the future, enable the analysis of the relevant analyte in real-time (on-line) to control the effectiveness of the course of the hemodialysis process.

Література/References:

1. Wyss M., Kaddurah-Daouk R. Creatine and Creatinine Metabolism // *Physiological Reviews*. – 2000. - V. 80, No. 3. – P. 1107-1214.
2. Zakalskiy A., Stasyuk N., Zakalska O., Boretsky Y., Gonchar M. Overexpression and one-step renaturation-purification of the tagged creatinine deiminase of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* cells // *Cell Biol. Intern.* – 2020. - V. 44, No. 5. – P. 1204-1211. <https://doi.org/10.1002/cbin.11320>

4. Очікувані наслідки від результатів проєкту, включаючи продовження співпраці в інших проєктах міжнародного співробітництва (до 1 сторінки А4, 12pt) / Expected impacts of project results, including continuation of cooperation in other international cooperation projects (up to 1 A4 size sheet, 12pt)

Поєднуючи різні галузі природничих наук (мікробіологію, біохімію, ензимологію, аналітичну біотехнологію, нанотехнологію та електрохімію) наші розробки в межах проєкту матимуть важливе фундаментальне і практичне значення та інноваційний характер. Залучення до проведення досліджень молодих учених становитиме важливий соціально-виховний ефект, створюючи сприятливі умови для набуття ними важливого наукового досвіду та відкриваючи перспективи подальшого кар'єрного росту. Одержані наукові результати буде висвітлено у спільних наукових публікаціях і виступах на міжнародних конференціях, а також буде використано для підготовки та подачі нових міжнародних та вітчизняних проєктів. Найбільш інноваційні результати будуть використані для подання заявок на патент. Отже, ми можемо зробити очікувати, що науковий, технічний, економічний та соціально-економічний ефекти від даного проєкту будуть значними.

Наші здобутки можуть бути в кінцевому рахунку важливими для фундаментальних і прикладних природничих наук. Очікуваний результат проєкту буде виходити за рамки існуючого рівня техніки, і наслідки виконання проєкту будуть інноваційними.

Combining the various fields of natural sciences (microbiology, biochemistry, enzymology, analytical biotechnology, nanotechnology, and electrochemistry), our developments within the project will be of fundamental and practical importance and is highly innovative. Engaging in the research for young scientists and students will be an important social and educational effect, creating favorable conditions for them to gain important scientific experience and opening up prospects for further career development. The obtained scientific results will be elucidated in joint scientific publications and speeches at international conferences, and will also be used for the preparation and submission of new international and domestic scientific projects. The most innovative results will be used for patent applications. Therefore, we can expect that the scientific, technical, economic, and social-economic effects of this project will be significant.

Our findings might be eventually important for fundamental and applied natural sciences. The expected outcome of the project goes beyond the existing state of the art and the project is expected to generate innovative results.

5. План роботи (робочі етапи) (далі – ПР) (до 1 сторінки А4, для кожного ПР, 12pt) / Work plan (work packages) (hereafter - WP) (up to 1 A4 size sheet, 12 pt, for each WP)

ПР № / WP No.:

Назва ПР / WP title:

Цілі ПР / WP objectives:

Заплановані завдання ПР та їх розподіл серед партнерів проєкту / WP planned tasks and their distribution among the Project Partners:

Name WP, describe what will be carried out to achieve the overall objective of the project. Describe the objective of the WP and list the tasks in a logical order, indicating the Partner (s) that will implement the WP task. Specify in a logical sequence all the WPs and the tasks to be undertaken.

№ 1. Препаративне виділення та очищення рекомбінантної креатиніндеїмінази (КДІ) з клітин мікробного надпродуцента фермента.

Для виділення й одноетапної очистки (His)₆-теговоаної рекомбінантної креатиніндеїмінази (КДІ) буде використано оригінальні підходи рефолдингу білка із тілець включення клітин рекомбінантних бактерій *E. coli* та метал-афінну хроматографію.

Клітини рекомбінантного штаму *E. coli* BL21 (DE3)/pET32a-codA, що містять плазмиду з клонованим (His)₆-тегованим геном codA, що кодує КДІ *Corynebacterium glutamicum*, вирощують у селективному середовищі LB з ампіциліном. Для індукції експресії КДІ у середовище вносять ізопропіл β-D-1-тіогалактопіранозид (ІПТГ) і клітини інкубують 3 год для досягнення найвищого рівня експресії ферменту за протоколом pET

System Manual (Novagen). Рекombінантний білок нагромаджується в клітинах *E.coli* як «тілець включення». Отримання та розчинення «тілець включення» здійснюють за протоколом Protein Refolding Kit (Novagen), дещо модифікованим нами. Індуковані клітини спершу обробляють лізоцимом, а згодом - ультразвуком на льоду до повного лізису клітин із подальшим значним зниженням в'язкості розчину. «Тілець включення» виділяють із клітинного лізату високошвидкісним центрифугуванням.

Після розчинення «тілець включення» у присутності 0,3% N-лауроїлсаркозину фермент буде ренатурований та очищений одноетапною процедурою з використанням метал-афінної хроматографії на Ni-NTA Superflow (Qiagen). Вихід (His)₆-тегової КДІ становитиме не менше 30 мг з 1 л культури. Очищений фермент є достатньо стабільним і володіє активністю 10-20 ОД./ мг. Під час тривалого зберігання при -20 °С у буфері, що містить 20% гліцеролу, фермент втрачає лише 30% своєї активності впродовж 4 місяців. Для забезпечення стабільності КДІ під час ліофілізації, буде використовуватись трегалоза як найбільш ефективний стабілізуючий агент. Це забезпечить збереження активності ферменту на 40% упродовж 120 днів зберігання висушеного порошку при 4 °С.

Українська команда відповідальна за це завдання.

Isolation and purification of creatinine deiminase (CDI) from the cells of recombinant microbial strain that overproduces the enzyme

For the isolation and one-step renaturation-purification of (His)₆-tagged recombinant creatine deiminase (CDI), original approaches of protein refolding from the recombinant *E. coli* cells and metal-affinity chromatography will be used. The cells of *E. coli* recombinant strain BL21(DE3)/pET32a-codA carrying the plasmid harbored (His)₆-tagged *codA* gene encoding CDI of *Corynebacterium glutamicum* will be grown in selective LB medium containing ampicillin. To induce the expression of CDI, the cells will be incubated in LB medium with antibiotic containing the isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) following the protocol of the pET System Manual (Novagen). The highest expression level of enzyme is achieved after 3 h of induction. The recombinant protein is accumulated in *E. coli* cells as inclusion bodies.

Preparation and solubilization of inclusion bodies will be carried out according to the protocol of the Protein Refolding Kit (Novagen) with several modifications. The induced cells will be treated with lysozyme and sonicated on ice until complete cellular lysis followed by substantial decrease of the solution viscosity. The inclusion bodies will be isolated from the crude cell lysate by high speed centrifugation.

After solubilization of inclusion bodies in the presence of 0.3% N-lauroylsarcosine, the enzyme will be renatured and purified by a single-step procedure using metal-affinity chromatography on Ni-NTA Superflow beads (Qiagen). The yield of the (His)₆-tagged CDI is approximately 30 mg from 1 L culture. The purified enzyme is sufficiently stable under conditions designed and possesses activity of 10-20 U/mg. During prolonged storage at -20 °С in the buffer, containing 20% glycerol, the enzyme loses only 30% of its activity within 4 months. Trehalose will be used as the most effective stabilizing agent during CDI lyophilization. It ensured maintainance of the enzyme's activity at 40% during 120 days of storage of the dried powder at 4 °С.

The Ukrainian team is responsible for this task.

№ 2. Розробка ензиматичного методу аналізу креатиніну за використання КДІ із спектрофотометричною та флуориметричною детекцією кінцевого продукту

Буде створено ензиматичний метод аналізу креатиніну із спектрофотометричною та флуориметричною детекцією продукту реакції. Тестування рекомбінантної креатиніндеімінази у ролі креатинін-селективного каталітичного елемента у складі лабораторного прототипу ензиматичного методу буде проведено. В якості хромогена для спектрофотометричного та флуориметричного визначення креатиніну буде використано орто-фталевий альдегід в присутності натрій сульфату. Основні аналітичні характеристики методу (лінійність, межа визначення та межа виявлення) будуть досліджені. *Українська та чеська команда відповідальні за це завдання.*

Development of CDI-based enzymatic method for the analysis of creatinine by means of spectrophotometric and fluorimetric detection of the final product

An enzymatic method for the creatinine analysis by means of spectrophotometric and fluorimetric detection of the reaction product will be developed. The testing of recombinant creatinine deiminase as a creatinine-selective catalytic element of the laboratory prototype of the enzymatic method will be carried out. An orthophthalic aldehyde in the presence of sodium sulfite will be used as a chromogen for spectrophotometric and fluorimetric determination of creatinine. The main analytical characteristics of the method (linearity, the limit of determination, and limit of detection) will be investigated. *Both Ukrainian and Czech teams are responsible for this task.*

№ 3. Скринінг та синтез нових хемосенсорних матеріалів, чутливих до іонів амонію

Буде запропоновано нові підходи до хімічного та електрохімічного синтезу і функціоналізації полімерних та металевих наночастинок (НЧ) та наностержнів (НР). Буде синтезовано полімерні наноплівки на основі поліпіролу, поліаніліну та політіофену. Отримані наноматеріали буде використано для створення гібридних метал-вмісних (ZnS(Hg)/Cu, Ni/графен, TiO₂) нанокомпозитів. Буде синтезовано також близько 20 варіантів моно- та біметалевих гібридних НЧ, до складу яких входитимуть 2-3 різних благородних або перехідних металів. Буде показано, що найбільш ефективні електроактивні НЧ та НР можуть бути не лише медіаторами електронного перенесення, але також і хемосенсорними мембранами, селективними до амонію. Формування цих композитів буде підтверджено методами скануючої електронної мікроскопії (СЕМ), атомно-силової мікроскопії (АСМ), енергетично дисперсійної рентгенівської (ЕДРС) та атомно-емісійної спектроскопії, а також електрохімічними методами за використанням потенціостата/гальваностата. *Українська та чеська команда відповідальні за це завдання.*

Screening and synthesis of new chemosensory materials sensitive to ammonium ions

The new approaches to the chemical and electrochemical synthesis and functionalization of polymer and metal nanoparticles (NPs) and nanorods (HPs) will be proposed. Polymeric nanolayers based on polypyrrole, polyaniline, and polythiophene will be synthesized. The obtained nanomaterials will be used to create hybrid metal-containing (ZnS (Hg) / Cu, Ni/graphene, TiO₂) nanocomposites. More than 20 variants of mono- and bimetallic hybrid NPs will be synthesized. They will include 2-3 different precious or transition metals. It will be shown that the most effective electroactive NPs and HPs can be not only electron transfer mediators but also chemosensory membranes selective for ammonium. The formation of these composites will be confirmed by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), energy dispersive x-ray (EDX) and atomic emission spectroscopy, as well as electrochemical methods using potentiostats. *Both Ukrainian and Czech teams are responsible for this task.*

№ 4. Створення та характеристика нового амперометричного біосенсора для визначення вмісту креатиніну на основі використання рекомбінантної КДІ та хемосенсорної мембрани, чутливої до іонів амонію

Для опрацювання амперометричного біосенсорного методу визначення вмісту креатиніну в біологічних рідинах буде використано рекомбінантну КДІ та відібрану хемосенсорну мембрану, чутливу до іонів амонію. В якості робочих, буде протестовано низку електродів різного типу та розміру поверхні (планарні та торцеві; на основі карбону чи благородних металів) та відібрано оптимальний тип трансдуктора. За допомогою циклічної вольтамперометрії та хроноамперометрії буде досліджено основні характеристики сконструйованих амоній-чутливих хемоелектродів (оптимальний робочий потенціал для детекції іонів амонію, чутливість, межі лінійності та ін.). З метою забезпечення збільшення локальної концентрації креатиніндеїмінази (КДІ) та підвищення його стабільності у приелектродному шарі буде проведена оптимізація умов іммобілізації фермента на поверхні хемосенсорних електродів. Оптимізація буде здійснюватись у двох основних напрямках: пошук матриць, оптимальних для іммобілізації фермента та вибору

методів іммобілізації і стабілізації ферментів (адсорбції, фізичної фіксації, ковалентного зшивання).

На основі оптимізованих хемоелектродів та оптимізованої біорозпізнаючої мембрани буде створено лабораторні прототип відповідного біосенсора та вивчено його основні біоаналітичні характеристики (афінність до субстрату, межа виявлення, чутливість, лінійність, селективність, стабільність, відтворюваність та ін.). **Українська та чеська команда відповідальні за це завдання.**

Construction and characterization of a new amperometric biosensor for the determination of creatinine, based on the use of recombinant CDI and selected chemosensory membrane sensitive to ammonium ions

To study the amperometric biosensor method for the determination of creatinine content in biological fluids, recombinant CDI and a selected chemosensory membrane sensitive to ammonium ions will be used. A number of electrodes of various types and surface sizes (planar and face; based on carbon or precious metals) will be tested as working electrodes and the optimal type of transducer will be selected. Cyclic voltammetry and chronoamperometry will be used to investigate the main electrochemical characteristics of the engineered ammonium-sensitive chemoelectrodes (optimal working potential for detection of ammonium ions, sensitivity, linearity limits, etc.). In order to increase the local concentration of creatinine deiminase (CDI) and improve its stability in the pre-electrode layer, the conditions of enzyme immobilization on the surface of chemosensory electrodes will be optimized. Optimization will be carried out in two main areas: search for matrices that are optimal for immobilization of the enzyme and the choice of methods for immobilization and stabilization of enzymes (adsorption, physical fixation, covalent cross-linking, etc.).

On the basis of the optimized chemoelectrodes and optimized biorecognition membrane, a laboratory prototype of the corresponding biosensor will be constructed and its main bioanalytical characteristics (affinity to the substrate, the limit of detection, sensitivity, linearity, selectivity, stability, etc.) will be investigated. **Both Ukrainian and Czech teams are responsible for this task.**

№ 5. Тестування створених ензиматичного та біосенсорного методів аналізу креатиніну на реальних клінічних зразках біологічних рідин людини

Розроблений ензиматичний набір та лабораторний прототип амперометричного біосенсора будуть тестовані на модельних та клінічних зразках біологічних рідин здорових донорів та пацієнтів із різними нефрологічними захворюваннями, зокрема: пієлонефрит, гломерулонефрит, пухлини нирок, туберкульоз та полікістоз нирок. Післяопераційне дослідження рівня сироваткового креатиніну буде проведено у пацієнтів після трансплантації нирки. Буде вивчено також можливість використання створених біоаналітичних методів для неінвазивного аналізу креатиніну в поті, слині та сечі людини. Буде створено пробний біоаналітичний ензиматичний набір для аналізу креатиніну та оптимізовано склад набору. **Українська команда відповідальна за це завдання.**

Testing the created enzymatic and biosensor methods for analysis of creatinine on the real clinical samples of human biological fluids

The developed enzymatic kit and laboratory prototype of amperometric biosensor will be tested on the model and clinical samples of biological fluids of healthy donors and patients with various nephrological diseases, in particular: pyelonephritis, glomerulonephritis, kidney tumors, tuberculosis, and polycystic tuberculosis. Post-operative study of serum creatinine levels will be performed in patients after kidney transplantation. The possibility of using the created bioanalytical methods for the non-invasive analysis of creatinine in sweat, saliva, and urine will also be investigated. A pilot bioanalytical enzymatic kit for creatinine analysis will be created and its composition will be optimized. **The Ukrainian team is responsible for this task.**

6. Графік виконання проєкту / Project implementation time schedule

Відповідне завдання ПР (має бути ідентичним нумерації завдань ПР, зазначених у пункті 5) / Corresponding WP task (must be identical to the numbering of the WP tasks specified in point 5)	Відповідальний за впровадження (відмітити хрестиком) / Responsible for implementation (cross mark)		Графік реалізації проєкту (квартали) / Project implementation schedule (quarters)								
	UA	CZ	Рік 1 / Year 1				Рік 2 / Year 2				
			1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.	
1.ПР / WP	X	-	■								
2.ПР / WP	X	X		■	■						
3.ПР / WP	X	X			■	■	■				
4.ПР / WP	X	X					■	■	■		
5.ПР / WP	X	-							■	■	

7. Роль/Експертиза партнерів / Role/Expertise of the partners

Український партнер (до 1,5 сторінки А4, 12pt) / Ukrainian partner (up to 1,5 A4 size sheet, 12 pt):

Describe briefly the role and expertise of the team. Specify the key team members (name, surname, degree) and the total number of team members. Explain the ability of the partners to complement each other. Provide information on available infrastructure and hardware required to carry out the activities planned in the project. Indicate the planned involvement of young scientists (scientist under 35 years) in the project (if applicable).

Український партнер (УП) представлений колективом з восьми науковців – професіоналів високого рівня в різних областях, зокрема мікробіології, ензимології, нанотехнології, біотехнології, аналітичної хімії та електрохімії. До виконання окремих етапів проєкту також будуть залучені молоді науковці та магістри.

УП має усе необхідне обладнання для проведення запланованих досліджень: 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 розробки ензиматичного набору (спектрофотометри «SHIMADZU UV-1650», флуориметр «Quantech filter»); 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); для проведення електрохімічних досліджень (комерційні планарні та торцеві електроди з різною природою робочої поверхні та різною величиною площі поверхні, електрохімічні комірки, потенціостати «CHI 1200A» та «PGstat16»).

Ukrainian partner (UA) is represented by a team of eight scientists - high-level professionals in various fields, including microbiology, enzymology, nanotechnology, biotechnology, analytical

chemistry and electrochemistry. Young scientists and masters will also be involved in the implementation of different project tasks.

UA has the material and hardware support for the planned researches: for cultivation of the microbial cells (culture media, sterile boxes, autoclaves, thermostats, thermostatic shakers, disintegrators, centrifuges "Sorvall", "Eppendorf", lyophilizer "Christ alpha 1-2 LDplus"; the equipment for isolation, purification of enzymes and study of their physico-chemical and kinetic characteristics (chromatographic columns, chromatographic carriers, apparatus for vertical electrophoresis of proteins VE-2M Helicon, peristaltic pumps, fraction collectors, refrigerators); for development of analytical kit (spectrophotometers "SHIMADZU UV-1650", fluorimeter "Quantech filter"); equipment for synthesis and characterization of micro- and nanoparticles (atomic force microscope "Solver P47-PRO (NT-MDT)", scanning electron microscope "SEM-microanalyser REMMA-102-02", transmission electron microscope "REM-100", fluorescence microscope "Axio Lab. A1 ", optical microscopes); apparatus for conducting electrochemical studies (commercial electrodes of different configuration and different surface area values, electrochemical cells, potentiostats "CHI 1200A" and "PGstat16").

Основні публікації науковців, які беруть участь у проєкті щодо теми проєкту (5 публікацій) / Major publications of the researchers involved in the project on the subject of the project (*specify 5 publications*):

1. Stasiuk N., Gaida G, Zakalskiy A., Zakalska O., Fayura L., Vovk O., Stasyk O, Sybirny A., Honchar M. Recombinant Forms of Arginase and Arginine Deiminase as Catalytic Components of «Argitest» Enzymatic Kit for L-arginine Analysis. *Sci. innov.* 2017, 13(4):56-63 DOI:[10.15407/scine13.04.056](https://doi.org/10.15407/scine13.04.056)
2. Smutok O., Karkovska M., Serkiz Y. et al. 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.* 2017, 250:469-475 (IF = 5.67) DOI:[10.1016/j.snb.2017.04.192](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.04.192);
3. Zakalskiy A., Stasyuk N., Gonchar M. Creatinine Deiminase: Characterization, Using in Enzymatic Creatinine Assay, and Production of the Enzyme. *Current Protein & Peptide Science.* 2019, 20(5):465-470 (IF = 2.696). DOI: [10.2174/1389203720666181114111731](https://doi.org/10.2174/1389203720666181114111731);
4. O. Demkiv, N. Stasyuk, A. Zakalskiy, O. Zakalska, T. Prokopiv, Y. Boretsky, M. Gonchar. Screening mold strains for an ability to synthesize creatinine deiminase. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology.* 2019, 81:122–129. DOI:[10.30970/vlubs.2019.81.13](https://doi.org/10.30970/vlubs.2019.81.13);
5. Zakalskiy A., Stasyuk N., Zakalska O., Boretsky Y., Gonchar M. Overexpression and one-step renaturation-purification of the tagged creatinine deiminase of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* cells. *Cell Biol. Intern.* 2020 (IF = 2.13) DOI:[10.1002/cbin.11320](https://doi.org/10.1002/cbin.11320).

Чеський партнер (до 1,5 сторінки A4, 12pt) / Czech partner (up to 1,5 A4 size sheet, 12 pt):
Describe briefly the role and expertise of the team. Specify the key team members (name, surname, degree) and the total number of team members. Explain the ability of the partners to complement each other. Provide information on available infrastructure and hardware required to carry out the activities planned in the project. Indicate the planned involvement of young scientists in the project (if applicable).

Чеські партнери (ЧП) за потенційним проєктом мають спеціалізоване обладнання, необхідне для запланованих досліджень. ЧП має високотехнологічне сучасне обладнання для конструювання та експлуатації амперметричних біосенсорів (АБС) і біопаливних комірок (БПК), а також для досліджень з розміру, форми та структури полімерів, нано- та біонаноматеріалів: потенціостат/гальваностат Autolab PGSTAT30 (Eco-Chemie); лазерний аналізатор Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments); UV–Vis спектрофотометр LAMBDA 25 (PerkinElmer Inc); мікроскопи – скануючий електронний FE-SEM SU-70 (Hitachi), атомно-силовий BioScope II (Veeco Instruments Ltd) і скануючий оптичний Alpha300R (WiTec); спектрометри – BX FTIR, Raman Station 400F і атомно-емісійний AAnalyst 880 (всі – від PerkinElmer Inc).

CZ has high-tech modern equipment for the development of amperometric biosensors (ABS) and biofuel cells (BFC), as well as for characterization of shape, size and structure of polymers, nano- and bionanomaterials: Potentiostat/galvanostat; Autolab PGSTAT302N, PGSTAT101 (Eco-Chemie)(2×), polarographic analyser 663 VA stand (2×). Scanning electrochemical microscope (SECM) (CH instruments). Atomic force microscope (AFM) Dimension FastScan Bio AFM with Bruker ScanAsys mode. Dynamic light scattering based particle size analyser equipped with red laser as light source Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). UV–Vis spectrophotometers; Infinit 2000 PRO for measuring absorbance and fluorescence, AnalytikJena Specord 210 featured with variable bandwidth, scanning and dual core, SPECORD® S 600 microscopes which provides fast analysis – Scanning electron microscope; SEM (Tescan MIRA II LMU) equipped with EDS and WDS. Transmission electron microscope (TEM) FEI Tecnai F20. Spectrometers - Nicolet iS10 FT-IR spectrometer with diamond ATR attachment. Renishaw InVia Reflex Raman microspectrometer equipped by the 514.5 nm line of an argon laser for excitation. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometer Analyst 880 (all – from PerkinElmer Inc).

Основні публікації науковців, які беруть участь у проєкті щодо теми проєкту (5 публікацій) / Major publications of the researchers involved in the project on the subject of the project (specify 5 publications):

1. Arbër Frangu, Amir M. Ashrafi, Milan Sýs, Tahir Arbnesi, Radovan Metelka, Vojtěch Adam, Milan Vlček and Lukáš Richtera: Determination of Trolox Equivalent Antioxidant Capacity in Berries, Using Amperometric Tyrosinase Biosensor Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Applied Sciences* 2020, 10(7), 2497. DOI: 10.3390/app10072497 (IF = 2.217).
2. Manuel David Peris-Díaz, Lukas Richtera, Ondrej Zitka, Artur Krężel and Vojtech Adam: A chemometric-assisted voltammetric analysis of free and Zn(II)-loaded metallothionein-3 states. *Bioelectrochemistry* 2020, 134, 107501. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107501 (IF = 4.474).
3. Amir M. Ashrafi, Milan Sýs, Eliška Sedláčková, Amir Shaaban Farag, Vojtěch Adam, Jan Příbyl and Lukáš Richtera: Application of the Enzymatic Electrochemical Biosensors for Monitoring Non-Competitive Inhibition of Enzyme Activity by Heavy Metals. *Sensors* 2019, 19(13), 2939. DOI: 10.3390/s19132939 (IF = 3.031).
4. Amir M. Ashrafi and Lukáš Richtera: Preparation and Characterization of Carbon Paste Electrode Bulk-Modified with Multiwalled Carbon Nanotubes and Its Application in a Sensitive Assay of Antihyperlipidemic Simvastatin in Biological Samples. *Molecules* 2019, 24(12), 2215. DOI: 10.3390/molecules24122215 (IF = 3.060).
5. Ana Đurović, Zorica Stojanović, Snežana Kravić, Jovana Kos and Lukáš Richtera: Electrochemical Determination of Vitamin D 3 in Pharmaceutical Products by Using Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis* 2019, 31. DOI: 10.1002/elan.201900532 (IF = 2.691).

8. Відрядження / Business trips

Відрядження до Чеської Республіки / Business trips to the Czech Republic

ПІБ, посада / Name, surname, position	Мета візиту / Purpose of the visit	Рік / Year	Тривалість візиту (до 30 днів за рік) / Duration of the visit
Михайло Гончар, Зав. відділом аналітичної біотехнології (ВАБ)	Координація досліджень Планування спільних експериментів.	2021	2

Mykhailo Gonchar, Head of Depart. of Analytical biotechnology (DAB)	Coordination of the work. Planning joint experiments.		
Стасюк Наталія, м.н.с. ВАБ Nataliya Stasyuk, Young Researcher of DAB	Експериментальна робота по синтезі та характеристиці наноматеріалів. Experimental work on the development and characterization of nanoparticles.	2021	4
Смуток Олег, ст.н.с. ВАБ Oleh Smutok, Senior Researcher of DAB	Експериментальна робота по характеристиці біосенсорів. Experimental work on the characterization of biosensors.	2021	4
Демків Ольга, м.н.с. ВАБ Olha Demkiv, Young Researcher of DAB	Експериментальна робота по тестуванні розроблених біосенсорів на реальних зразках сироваток крові. Experimental work on the testing biosensors on the real samples.	2022	4

Відрядження в Україну / Business trips to Ukraine

Ім'я, прізвище, посада / Name, surname, position	Мета візиту / Purpose of the visit	Рік / Year	Тривалість візиту / Duration of the visit
Лукаш Ріхтера, магістр; Амірмансур Ашрафі, к.т.н. Lukas Richtera M.Sc.; Amirmansoor Ashrafi, Ph.D.	Координація спільних досліджень. Обговорення наукових результатів. Coordination of the joint work. Discussion of the scientific results.	2021	3
Лукаш Ріхтера, магістр; Амірмансур Ашрафі, к.т.н. Lukas Richtera M.Sc.; Amirmansoor Ashrafi, Ph.D.	Обговорення наукових результатів. Планування наступних спільних проєктів. Discussion of the scientific results. Planning the future joint projects.	2022	3

9. Витрати на реалізацію проєкту для українського партнера, грн / Project implementation costs for Ukrainian partner, UAH
--

Витрати	Рік 1, UAH	Рік 2, UAH
1. Прямі витрати / Direct costs:		
1.1. Витрати на оплату праці, включаючи податки (макс. 53% від загального обсягу витрат) / Remuneration of the research staff employed in the project, including Compulsory State Social Insurance Contributions	78 тис. грн	78 тис. грн
1.2. Матеріали, необхідні для виконання робіт, крім спецустаткування (10-20% від загального обсягу витрат) / Materials, consumables supplies and similar products	22 тис. грн	30 тис. грн
1.3. Витрати на службові відрядження (згідно з запланованими відрядженнями) (відповідно до Постанови КМУ від 02.02.2011 №98) / Travel expenses (Specify planned business trips)	18 тис. грн	8 тис. грн
2. Непрямі витрати (не більше 30% від загального обсягу витрат) / Indirect costs (up to 30% of the total direct costs of the project)	32 тис. грн	34 тис. грн
Разом*, грн / Total, UAH	150 тис. грн	150 тис. грн

* - розрахункова сума на фінансування проекту залежить від затвердженого бюджету на відповідний рік і орієнтовно становить 150 тис. грн на рік

Інтелектуальна власність: Кожна сторона несе відповідальність за моніторинг захисту інтелектуальної власності, створеної в межах Проекту відповідно до міжнародних угод, підписаних Сторонами.

Intellectual property: Each party is responsible for monitoring the protection of the intellectual property created under the Project in accordance with international agreements signed by the Parties.

Ми погоджуємось, що Міністерство освіти і науки України та Міністерство освіти, молоді та спорту Чеської Республіки буде обробляти персональні дані, що містяться в проекті, шляхом адміністративної оцінки проекту та публікуватиме проекти, затверджені для реалізації на вебсайтах зазначених Міністерств.

We agree that the Ministry of Education and Science of Ukraine and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic will process personal data contained in the project through the administrative evaluation of the project and the publication of the supported projects on the mentioned above Ministry's websites.

Чеський партнер (CZ) / Czech partner (CZ):



Науковий керівник / Principal investigator	Керівник науково-дослідної групи синтезу та хімічних аналізів Leader of Research Group of Synthesis and Chemical Analyzes. <hr/> <i>(посада / position)</i>
ПІ / Name and surname	Лукас Ріхтера, к.т.н., д.х.н. Lukas Richtera RNDr., Ph.D. <hr/>
Дата / Date	<u>dd.mm.2020.</u>
Підпис / Signature	_____
Керівник установи / Legal representative of the institution	<hr/> <i>(посада / position)</i>
ПІ / Name and surname	<hr/>
Дата / Date	<u>dd.mm.2020.</u>
Підпис / Signature	_____
Печатка / Stamp	

Український партнер (UA) / Ukrainian Partner (UA):

Науковий керівник / Principal investigator	Зав. відділом аналітичної біотехнології Head of the Department of Analytical Biotechnology <hr/> <i>(посада / position)</i>
ПІБ / Name and surname	Гончар Михайло Васильович Mykhailo Gonchar <hr/>
Дата / Date	<u>dd.mm.2020.</u>
Підпис / Signature	_____
Керівник установи / Legal representative of the institution	Директор Інституту біології клітини НАН України Head of Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine <hr/> <i>(посада / position)</i>
ПІБ / Name and surname	Сибірний Андрій Андрійович Andriy Sibirny <hr/>

Дата / Date

dd.mm.2020.

Підпис / Signature

Печатка / Stamp