

ЗАПИТ

на виконання науково-технічного проєкту

1. Назва науково-технічного проєкту

Створення біоаналітичного набору для аналізу аргініну та цитруліну в біологічних рідинах

2. Вид тематики

II. Програмно-цільова та конкурсна тематика НАН України

3. Назва цільової програми або цільового проєкту

Науково-технічні проєкти установ НАН України 2021 року

4. Назва розділу програми або напрямку цільового проєкту

8. Новітні біотехнології для охорони здоров'я, фармакології та агропромислового комплексу

5. Строки виконання науково-технічного проєкту 2021 р.

6. Код програмної класифікації видатків

6541030 *(прикладні дослідження)*

7. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

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

Технології створення молекулярно-діагностичних систем та терапевтичних засобів, ферментних та бактеріальних препаратів

Молекулярні біотехнології створення нових організмів та продуктів для сільського господарства, фармацевтичної та харчової промисловості

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

н е м а є

10. Науковий керівник науково-технічного проєкту

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
Стасюк Наталя Євгенівна	к.х.н., молодший науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (032)-261-21-44, e-mail: stasuk_natalia@ukr.net	
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	
Фаюра Любов Романівна	к.б.н., науковий співробітник, ІБК НАН України, тел.: (380-32) 261-21-42, e-mail: fayural@gmail.com	

12. Установи - співвиконавці

н е м а є

13. Ключові слова

Ензиматичний аналіз, аргінін, цитрулін, флуориметрія, біоаналітичний набір

14. Резюме

L-Аргінін – напівзамінна амінокислота, яка служить попередником для біосинтезу багатьох біоактивних сполук, включаючи оксид нітрогену, поліаміни, симетричні та несиметричні диметильовані похідні гуанідину, гомоаргініну, а також пептиди і білки. Рівень L-аргініну в сечі є маркером гомозиготної цистинурії та обструктивної нефропатії новонароджених. Визначення вмісту L-аргініну у сироватці крові дозволяє діагностувати у немовлят важке генетичне захворювання – аргінінемію, а також вивчати особливості перебігу таких захворювань, як артеріальна гіпертензія, гестоз вагітних та інші акушерські ускладнення, серцево-судинні, нейродегенеративні, легеневі, аутоімунні захворювання, сепсис, астма, обструктивні захворювання дихальних шляхів та муковісцидоз, запалення кишківника, агресивні гепатокарциноми, меланоми шкіри та колоректальний рак.

L-цитрулін є одним із важливих регуляторів проміжного обміну в організмі. Встановлено, що визначення рівня L-цитруліну в крові може використовуватись як специфічний біохімічний маркер для оцінки функціонального стану проксимальних каналців нирок, ступеня пошкодження нирок і виявлення ниркової недостатності за різних патологічних станів. Зміни величини цього показника прямо корелюють із вмістом креатиніну в плазмі крові. Встановлено, що рівень L-цитруліну в плазмі крові зростає вже на початкових стадіях розвитку помірної ниркової недостатності, ще до виражених змін вмісту креатиніну і сечовини в крові. Особливий інтерес становить цей показник у діагностиці серцево-судинних захворювань. У пацієнтів з артеріальною гіпертензією визначення вмісту L-цитруліну може бути використано як специфічний маркер пошкодження нирок.

Метою даного проєкту є доопрацювання створеного нами нового флуориметричного ензиматично-хімічного методу одночасного аналізу вмісту L-аргініну та L-цитруліну, розробка ензиматичного набору для аналізу вказаних метаболітів у біологічних рідинах

людини, виготовлення пробної серії аналітичного набору та підготовка науково-технічної документації на набір (Інструкція та лабораторний регламент виготовлення).

У цьому проєкті буде доопрацьовано метод аналізу L-аргініну та L-цитруліну в крові із флуориметричною детекцією продукту реакції за використання рекомбінантної аргініндеїмінази (АДІ) та 2,3-бутандіонмонооксиду (ДМО); буде досліджено основні аналітичні характеристики АДІ-ДМО методу (селективність, чутливість, межа визначення); буде проведено тестування розробленого методу для аналізу вмісту аргініну та цитруліну у біологічних рідинах здорових донорів та пацієнтів із різними захворюваннями; буде виготовлено пробну серію аналітичного набору, створеного на базі опрацьованого методу. З метою реалізації поставлених завдань буде використано рекомбінантну АДІ, виділену з клітин рекомбінантного бактерійного штаму, який сконструйовано в Інституті біології клітини НАН України.

За результатами досліджень з доопрацювання АДІ-ДМО методу, його випробування та створення аналітичного набору буде підготовлено наукові публікації в фахові журнали та подано патент України на набір (як корисну модель). Завдяки використанню простих та дешевих компонентів, собівартість продукту буде невисокою, відповідно, кінцева ціна на ензиматичний набір може бути нижчою у декілька разів у порівнянні з існуючими зарубіжними комерційними аналогами.

Запропонований ензиматично-хімічний АДІ-ДМО метод одночасного кількісного аналізу L-аргініну та L-цитруліну може слугувати надійною основою для розроблення відповідних державних стандартів визначення вмісту цих амінокислот та для випуску комерційного аналітичного набору, який може бути впроваджено в клінічну практику в короткі терміни.

15. Обґрунтування доцільності виконання науково-технічного проєкту

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

Цілі і завдання роботи - доопрацювати новий флуориметричний ензиматично-хімічний метод одночасного аналізу вмісту L-аргініну та L-цитруліну в крові, здійснити тестування нового методу аналізу на реальних зразках біологічних рідин людини, розробити аналітичний набір для визначення вказаних метаболітів у біологічних рідинах людини, виготовити пробну серію ензиматичного набору та підготувати науково-технічну документацію на нього (Інструкцію та лабораторний Регламент виготовлення набору).

На даний час тест-системи для одночасного визначення вмісту аргініну та цитруліну у біологічних рідинах, зокрема крові, в арсеналі засобів вітчизняної клінічної діагностики відсутні. Відомі ензиматичні методи аналізу аргініну зазвичай базуються на використанні кількох ензимів та мають низку недоліків, таких як низька селективність, необхідність використання екзогенного кофактору, що додатково підвищує вартість методу та ускладнює процедуру аналізу.

Аргінін та його похідні, L-цитрулін, зокрема, можуть бути важливими біомаркерами у діагностиці багатьох захворювань. L-аргінін є попередником для синтезу L-орнітину, L-цитруліну, L-путатіону, γ -аміномаєляної кислоти, спермідину та низки інших важливих для організму сполук [1]. Метаболізм аргініну відбувається, як мінімум, двома альтернативними шляхами: 1) окисним (за участі синтази Нітроген(II) оксиду) з утворенням L-цитруліну та нітроген(II) оксиду; 2) неокисним (за участі аргінази I типу) з утворенням L-орнітину та сечовини. Можливе й одночасне протікання цих двох процесів [2]. Ключові процеси метаболізму аргініну та цитруліну відбувається в трьох органах – кишківнику, печінці та нирках [3-4]. Основна кількість цитруліну синтезується з путаміну, який надходить з їжею, в епітеліальних клітинах кишківника. Цитрулін може утворюватись у ентероцитах і з аргініну за участі аргінази II типу (EC 3.5.3.1) та орнігінкарбамоїлтрансферази (EC 2.1.3.3) [4]. Утворений цитрулін вивільняється в кров та посилено захоплюється клітинами проксимальних каналців нирок, де і відбувається його перетворення до аргініну за послідовної участі аргініносукцинатсинтетази та аргініносукцинатліази. Отже, утворення цитруліну в кишківнику виступає важливим регулятором рівня синтезу аргініну в нирках.

Одним із важких захворювань, які можна діагностувати шляхом аналізу вмісту аргініну і цитруліну, є гіпераргінінемія – генетична патологія, викликана дефіцитом аргінази I типу, яка зазвичай не викликає катастрофічної амоніємії новонароджених. Однак, в перші роки життя таке захворювання

проявляється прогресуючими неврологічними симптомами, включаючи судоми, та супроводжується важкими печінковими патологіями, зокрема, холестаазом, гострою печінковою недостатністю або фіброзом печінки. У деяких економічно розвинутих країнах уряд фінансує програми моніторингу вмісту аргініну в крові новонароджених, оскільки своєчасна діагностика дозволяє розпочати адекватне лікування і зупинити розвиток цього рідкісного, але вкрай небезпечного захворювання [2, 4]. Однак, в Україні такої програми на сьогодні немає.

Відомо, що зміна рівня аргініну в сечі є маркером гомозиготної цистинурії та обструктивної нефропатії новонароджених [3]. Існують дані, що визначення вмісту аргініну в сироватці крові дозволяє діагностувати та вивчати особливості перебігу таких захворювань як артеріальна гіпертензія, гестоз вагітних та інші акушерські ускладнення [5], серцево-судинні, нейродегенеративні, легеневі, аутоімунні захворювання, сепсис, астма [6], обструктивні захворювання дихальних шляхів, муковісцидоз [7] та запалення кишківника. Моніторинг вмісту аргініну і цитруліну в плазмі крові здійснюють при довенному введенні цих амінокислот в процесі діагностики та експериментального дослідження захворювань ендокринної системи [4, 8-10].

Визначення вмісту цитруліну в крові може бути використано як специфічний біохімічний маркер для оцінки функціонального стану проксимальних каналців нирок, ступеня їхнього пошкодження і наявності ниркової недостатності за різних патологічних станів [11]. Зокрема, показано, що рівень цитруліну в плазмі крові зростає вже на початкових стадіях розвитку помірної ниркової недостатності ще до помітних змін вмісту таких звичних для аналізу у клінічній практиці маркерів, як креатинін і сечовина [12-17]. Таким чином, вміст цитруліну в крові є інтегральним біохімічним маркером характеристики стану системи травлення, проміжного обміну та забезпеченості організму аргініном.

Отже, визначення вмісту L-Arg і цитруліну в крові є актуальним для клінічної діагностики, моніторингу процесу лікування та оцінки якості фармацевтичних препаратів. Однак, більшість відомих методів визначення вмісту цих практично важливих аналітів має низку недоліків, основні із яких: низька селективність, громіздкість та коштовність апаратури і чутливість до інтерферуючого впливу супутніх речовин. З огляду на це, пошук нових високоселективних та чутливих методів визначення вмісту L-Arg, зокрема ензиматичних, створення комерційно-вигідних ензиматичних наборів є дуже актуальним. Найперспективнішими для розробки таких методів є ферменти метаболізму L-Arg, зокрема, аргіназа I, аргініндеїміназа (АДІ), аргінін-декарбоксилаза.

Запропонований авторами розробки метод і аналітичний набір для аналізу аргініну та цитруліну, завдяки нижчій собівартості, може скласти конкуренцію високоефективній рідинній хроматографії в клінічній практиці та наукових дослідженнях. Метод можна використовувати для виявлення дефіциту аргініну і цитруліну в біологічних рідинах вагітних (не менше як кілька мільйонів аналізів щороку), оцінки важкості перебігу аутоімунних та інших захворювань, а також контролю рівня аргініну і цитруліну в крові людей, які приймають аргініновмісні харчові біодобавки.

Таким чином, визначення рівня аргініну і цитруліну в біологічних рідинах як маркерів гіпераргінінемії, порушень обмінних процесів, ступеня тяжкості серцевої недостатності в пацієнтів з патологією серцево-судинної системи та ін., а також ефективності та безпечності застосування лікарських засобів є актуальним для вдосконалення системи охорони здоров'я.

15.2. Стан розроблення проблеми.

В Україні відсутні вітчизняні ензиматичні набори для одночасного визначення вмісту аргініну та цитруліну.

На сьогодні, вміст аргініну та цитруліну визначають методами іонообмінної хроматографії, включно з високоефективною рідинною хроматографією [1-2], а також із застосуванням спектрофотометрії [3-4], флуориметрії, хемілюмінесценції [5-6] та деяких інших підходів [7-10]. Недоліками перерахованих методів є те, що вони потребують коштовного спеціального обладнання та високо-кваліфікованих операторів.

Щодо країн зарубіжжя, то ензиматичні набори існують, проте вони досить дорогі. При цьому, існуючі ензиматичні тест-системи є переважно мультиферментними із спектрофотометричним детектуванням кінцевого продукту реакції. Зокрема, в роботі [8] повідомляється про розробку ензиматичного методу аналізу аргінін з використанням п'яти ферментів: АДІ,

аргініносукцинатсинтетази, піруватфосфатдікінази, піруватоксидази та пероксидази хрону з утворенням кольорового продукту, який кількісно оцінюється спектрофотометрично за зміною оптичної густини реакційної суміші при 555 нм. Для кількісного аналізу аргінін, фірма «Megazyme» (Ірландія) виготовляє набір для визначення аргініну у винах на основі трьох ензимів: аргінази, уреази та глутаматдегідрогенази. Вміст аргініну визначають за утворенням NADP^+ з NADPH в результаті послідовних ензиматичних реакцій гідролізу аргініну до аміаку та його утилізації в глутамат-утворюючій реакції. Лінійний діапазон визначення концентрації аргініну лежить в межах 1,0 – 35,0 мг/л (5,7 – 200,0 мкМ), нижня межа визначення становить 0,368 мг (2,1 мкМ). Вартість набору фірми «Megazyme», який розрахований на 150 аналізів, становить 163 євро. Інший набір для визначення вмісту аргініну в крові виробництва фірми «Cayman Chemical Company» (США) пропонується лише для наукових досліджень, але не для клінічної діагностики. В основі методу лежить імуоферментний аналіз (ELISA). Лінійний діапазон визначення концентрації аргініну знаходиться в межах 1,2 – 100, 0 мг/л (6,9 – 574,0 мкМ), нижня межа визначення становить 0,44 мг/л (2,5 мкМ). Вартість такого набору, розрахованого на 100 аналізів, становить близько 410 євро. Ще кілька фірм випускають аналогічні за принципом роботи аналітичні набори, наприклад, «Shanghai Crystal Day Biotech Co., LTD.

Рівень L-цитруліну визначають колориметричним методом за допомогою набору «L-Citrulline K 6600» компанії «Immundiagnostik AG» (Німеччина), лінійний діапазон визначення концентрації аргініну лежить в межах 6-400 мкМ.

Отже, підсумовуючи огляд існуючих на сьогодні ензиматичних методів визначення аргініну, можна зробити висновок, що переважна їх більшість має низку недоліків, зокрема, використання каскаду реакцій, які включають кілька ферментів; неабсолютну селективність до цільового аналіту; необхідність використання екзогенного кофактору чи ферментів, що додатково підвищує вартість методів та ускладнює процедуру аналізу.

Авторами проєкту в 2015 р. створено аналітичний набір «Аргігест» для визначення аргініну в крові (в рамках науково-технічного проєкту НАН України), який базується на створеному авторами оригінальному ензиматично-хімічному методі “Аргіназа-ДМО”. Метод має низку переваг порівняно із відомими методами визначення вмісту аргініну. Для аналізу застосовуються препарати рекомбінантної термостабільної аргінази, одержані за використання сконструйованих нами штамів-надпродуцентів та очищені за власними технологіями, що суттєво знижує матеріальні затрати при виготовленні аналітичного набору.

Слід відзначити високу селективність та нечутливість методу “Аргіназа-ДМО” до інтерферуючої дії багатьох сполук, зокрема, амінокислот, стабільність ферментного препарату та продукту реакції, простоту та швидкість процедури аналізу (50 хв.), надійність та комерційну доступність набору. Метод дозволяє підвищити точність визначення концентрації аргінін за рахунок високої селективності аргінази I та високого ступеня очищення ферментного препарату.

У поточному проєкті на відміну від попереднього, використовується інший, селективний до аргінін фермент – рекомбінантна аргініндеміназа. Поєднання ензиматичної та хімічної реакцій дозволяє одночасно визначити вміст двох біомаркерів - L-аргініну і L-цитруліну. Враховуючи необхідність простого та ефективного методу одночасного визначення вмісту аргініну і цитруліну у різних галузях медицини та біотехнології, ринок України виглядає досить перспективним. Паралельно буде вестись пошук іноземних компаній-виробників аналітичних продуктів з метою випуску та впровадження розробленої тест-системи за межами України. Потенційними споживачами аналітичного продукту можуть бути клінічні і фармацевтичні лабораторії, а також науково-дослідні установи. Пропонована розробка відповідає рівню кращих зарубіжних прототипів і не має аналогів в Україні.

Цитована література до розділу 15.2:

1. Parniak M. I., Lange G., Viswanatha T. (1983). *J. Biochem. Biophys. Meth.* 7(4), 267–276.
2. Narezhnaya E.V., Askalepova O.I., Nikashina A.A. (2010). *J. Anal. Chem.* 65 (2), 1280–1283.
3. Sakaguchi S. (1925). *J. Biochem.* 5, 25–32.
4. Boyde T., Rahmatullah M. (1980). *Anal. Biochem.* 107, 424-431.
5. Mayoral J. G., Alarcón F. J., Martínez T. F. et al. (2010). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 1–8.
6. Notenboom C.D., Veerdonk F.C.G., Kamer J.C.A. (1967). *J. Histochem.* 18, 117–121.

7. Zhang L., Liu Y., Chen G. (2004). *J. Chromatogr. A.* 1043 (2), 317–321.
8. [Kameya M.](#), [Asano Y.](#) (2014) [Enzyme Microb Technol.](#) 2014 (57) 36-41.
9. [Verma, N.](#), [Singh, A.K.](#), Singh, M. (2017). [Biochemistry and Biophysics Reports.](#) 12, 228–239.
10. Soldatkin, O.O., Prilipko, V.O., Kuibida, M.A. et al. (2017) *Sensor Electronics and Microsystem Technologies.* 14, 74–87.

15.3. Досвід і доробок авторів

Пропонована розробка є результатом і логічним продовженням кількох нових фундаментальних досліджень та науково-технічних проектів, що були профінансовані НАН України протягом останніх 10 років:

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) «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.;

3) «Створення продуцентів рекомбінантних аргіназ людини та вивчення впливу препаратів цих ферментів на проліферацію, апоптоз та автофагію нормальних та пухлинних клітин людини і тварин» (№ держреєстрації 01072000281), 2007-2009 рр.;

4) «Клонування та гетерологічна експресія генів мікроорганізмів та рослин, що кодують ферменти катаболізму аргініну і його біосинтетичних попередників; з'ясування молекулярних механізмів дії та їх використання для пригнічення росту пухлинних клітин *in vitro* та *in vivo*» (2007-2011 рр.);

5) «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.

6) «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору "Аргігест" для аналізу аргініну в клінічних зразках. Розділ 1. Оптимізація складу набору, умов проведення аналізу та розробка науково-технічної документації», науково-технічний проект НАН України (№ держреєстрації 0115U00185), 2015 р.

У результаті виконання останнього проекту, було розроблено та оптимізовано ензиматичний набір «Аргігест» на основі рекомбінантної аргінази, виділеної з клітин дріжджів за власною технологією, та 2,3-бутандіонмонооксиму. Було проведено випробування набору «Аргігест» на реальних зразках сироватки крові людей, встановлено границі норми вмісту аргінін у здорових людей, які корелюють із літературними даними. Підготовлено комплект технічної документації на набір «Аргігест» (Лабораторний регламент, Технічні умови та Інструкцію з експлуатації). Виготовлено пробну партію набору «Аргігест» та протестовано на реальних зразках крові людей із різноманітними захворюваннями.

Автори проекту мають значний досвід по створенню та впровадженню в практику біоаналітичних продуктів. Зокрема, розроблено і впроваджено у промислове (або малосерійне) виробництво ензиматичні набори для визначення глюкози - «ДІАГЛЮК» (перший на теренах колишнього Союзу) та «ДІАГЛЮК-2», етанолу («АЛКОТЕСТ»), метанолу, холестеролу. Готові для впровадження нові біоаналітичні продукти – «ЛАКТАТЕСТ» і «ФОРМАТЕСТ», «АРГІТЕСТ», створено нові лабораторні прототипи біосенсорів на основі генетично модифікованих клітин метилотрофних дріжджів та ферментів.

Про належний рівень кваліфікації виконавців свідчать їх публікації в міжнародних виданнях (сумарний імпаکت-фактор за останні 5 років складає понад 60 та участь у багатьох міжнародних проектах, зокрема: NATO scientific project in the frame of the Program “Science for Peace and Security” SPS(NUKR)SFPP 984173 “Novel electrochemical Nano-Sensors for toxic ions Detection” (2012-2013), Polish-Ukrainian “Scientific integration of the Polish-Ukrainian borderland area in the field of monitoring and detoxification

of harmful substances in environment” (2013-2015), українсько-литовський проєкт МОН України «Розробка біосенсорів і біопаливних комірок за використання оксидоредуктаз» (2020-2021 рр)

Останні публікації авторів, дотичні до запропонованого проєкту, представлені нижче (розділ 16).

15.4. Структура досліджень.

Завдання проєкту:

1. Доопрацювати ензиматично-хімічний метод одночасного аналізу L-аргініну та L- цитруліну на основі рекомбінантної аргінідеїмінази та відповідної флуориметричної детекції продукту реакції;
2. Здійснити тестування розробленого методу аналізу L-аргініну і L-цитруліну на біологічних рідинах людини.
3. Створити біоаналітичний ензиматичний набір для аналізу L-аргініну та L-цитруліну та підготувати науково-технічну документацію на нього (Інструкція, лабораторний регламент виготовлення).

Етапи виконання проєкту:

1. Доопрацювання методу одночасного аналізу L-аргініну та L-цитруліну із флуориметричною детекцією продукту реакції. Дослідження основних аналітичних характеристик методу (чутливість, межа визначення, селективність).
2. Тестування розробленого методу для аналізу вмісту L-аргініну та L-цитруліну в біологічних рідинах здорових донорів та пацієнтів із різними захворюваннями.
3. Створення біоаналітичного ензиматичного набору для аналізу L-аргініну та L-цитруліну. Оптимізація складу набору та підготовка науково-технічної документації на біоаналітичний набір (Інструкція, лабораторний регламент виготовлення).

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Учасники запропонованого проєкту мають наступне апаратне забезпечення: для культивування мікроорганізмів (стерильний бокс, автоклав, термостати, термостатовані струшувачі); для руйнування клітин (дезінтегратор, центрифуги, мікроцентрифуга "Eppendorf" Micro-22R), для виділення ензимів з наступним аналізом їхньої частоти і активності (хроматографічні колонки, рН-метри, сорбенти, перистальтичні помпи, колектори фракцій, холодильники, спектрофотометр SHIMADZU UV-1650, спектрофлуориметр Quantech (Thermo Scientific, США), прилад для вертикального електрофорезу на пластинах VE-2M "Хелікон"); реактиви та лабораторний посуд, які необхідні на кожній стадії виконання проєкту.

16. Техніко-економічне обґрунтування

У результаті попередніх досліджень в ІБК НАН України сконструйовано рекомбінантний штам *E. coli* - надпродуцент аргініндеімінази (АДІ). Оптимізовано умови культивування клітин продуцента, розроблено просту та економічно вигідну технологію одержання високоочищеного препарату АДІ з клітин цього штама [1]. Нещодавно, за використання аргінази, виділеної із клітин дріжджових рекомбінантних штамів-надпродуцентів, розроблено чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу L-аргініну із спектрофотометричним та флуоресцентним способом детектування кольорового продукту реакції за допомогою 2,3-бутандіонмонооксиму ДМО. Оскільки завершальна реакція визначення аргініну і цитруліну ґрунтується на реакції ДМО із уреїдною групою цитруліну, тестовані біологічні рідини будуть оброблятися уреазою для усунення/розкладання ендогенної сечовини. Запропоновані методики є простими у виконанні, не потребують складної підготовки зразків до аналізу. Розроблені методи визначення аргініну апробовано на реальних зразках вин, сироваток крові, фармацевтичних препаратів [2-3]. Встановлено високий рівень кореляції ($R=0,998$) між ензиматичними та біосенсорними методами у порівнянні із референтними методами [4-8]. Препарати АДІ володіють високою стабільністю, тому можна прогнозувати перспективність розробки та випуску ензиматичних наборів для визначення вмісту аргініну і цитруліну для застосування їх у лабораторній практиці.

Потенційними споживачами аналітичного продукту можуть бути клінічні, ветеринарні і фармацевтичні лабораторії, а також науково-дослідні установи. Запропонований нами метод може лягти в основу тест-системи для виявлення спадкового захворювання гіпераргінінемії. Державні програми скринінгу крові немовлят на вміст аргініну існують у економічно розвинутих країнах, зокрема, у деяких штатах США. Своєчасне діагностування небезпечного захворювання дозволить розпочати лікування дитини та зупинити розвиток хвороб. Відповідно, число необхідних аналізів визначається кількістю новонароджених в Україні щороку, а це близько 0,5 млн осіб (за даними 2019 р. – 310,6 тис. новонароджених). Крім того, запропонований метод можна використовувати для виявлення дефіциту аргініну і цитруліну у вагітних (не менше як мільйон аналізів щороку), оцінки важкості перебігу аутоімунних та інших захворювань, а також контролю рівня аргініну і цитруліну в крові людей, які приймають аргініновмісні харчові біодобавки.

Для прикладу, для проведення аналізу на вміст амінокислот, включаючи аргініну в діагностичній лабораторії "Синево" зразки крові з України надсилають в Німеччину, результати аналізу стають відомими тільки за 12 днів. Такий аналіз в "Синево" коштує на сьогодні 4000 грн. Завдяки нижчій собівартості, запропонований авторами проєкту швидкий ензиматично-хімічний метод (і відповідний біоаналітичний набір) для аналізу вмісту аргініну та цитруліну може скласти конкуренцію високоєфективній рідинній хроматографії в клінічній практиці та наукових дослідженнях. Таким чином, визначення вмісту аргініну і цитруліну в крові як маркерів порушень обмінних процесів, ступеня тяжкості серцевої недостатності в пацієнтів з патологією серцево-судинної системи, а також ефективності та безпечності застосування лікарських засобів є актуальним для вдосконалення системи охорони здоров'я.

Цитована література до розділів 15.3 - 16:

1. Сибірний А.А., Фаюра Л.Р., Борецький В.Ю. та ін. Пат. України на винахід № 66335; заявл.22.07.2011; опубл.26.12.2011, бюл. № 24.
2. Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Пиняга Ю.В. та ін. (2014) Наука та інновації 10 (4): 32-39.
3. Stasyuk N.Y., Gayda G.Z., Fayura L.R. et al (2016) Food Chemistry. 201:320-326.
4. Гайда Г.З., Стасюк Н.С., Борецький Ю.Р. та ін. Патент України на корисну модель №108773. опубл. 25.07.2016. Бюл. №14. С. 1-7.
5. Zhybak M.T., Fayura, L.Y. Boretsky Y.R. et.al (2017) Microchimica Acta.184: 8:2679-2686.
6. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G. et al. (2011) J. Mater. Sci. Eng. A. 1(6):819-827.
7. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G. et al. (2012) Biosens. Bioelectron. 37:46–52.
8. Stasyuk N.Ye., Gayda G.Z., Gonchar M.V. (2014) Sensors & Actuators B. (Chemical). 204:515-521.
9. Gayda G., Stasyuk N., Klepach H. et.al (2015) In: Living Organisms and Bioanalytical Approaches for Detoxification and Monitoring of Toxic Compounds. Rzeszow: Rzeszow University. 73–98.
10. Карковська М.І., Стасюк Н.С., Гайда Г.З. та ін. (2017) В кн.: ред. Р.С. Стойка) Багатофункціональні наноматеріали для біології і медицини: молекулярний дизайн, синтез і застосування. С. 165–177.

11. Гайда Г.З., Стасюк Н.Є., Гончар М.В. (2014) Biotechnologia acta. 7: 31-39.
12. Stasyuk N., Gaida G., Gonchar M. (2013) App. Biochem. Microbiol. (Moscow). 49 (5):529 - 534.
13. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Закальський А.Є. та ін. Патент України на корисну модель №107543. Опубл. 10.06.2016. Бюл. №11. – С. 1-5.
14. Stasyuk N., Gayda G., Yepremyan H., Gonchar M. (2017) Spectrochimica Acta. 170: 184-190.
15. Стасюк Н.Є., Гайда Г.З., Закальський А.Є. та ін. (2017) Наука та інновації. 13 (4): 65-74.
16. Stasyuk N., Synenka M., Gayda G. et al. (2016) Eureka: Life Science 1:22-28.
17. Stasyuk N., Gayda G., Zakalskiy A. et al. (2018) Spectrochimica Acta. Part A. 193: 349-356

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

- немає аналогів у світі або краща за існуючі у світі аналоги
- немає аналогів в Україні
- краща за існуючі в Україні аналоги за всіма основними показниками
- перевищує існуючі в Україні аналогічні розробки за окремими показниками

18 Використання результатів науково-технічного проєкту

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

Найменування результатів, ОІВ	Назва підприємства, організації, де передбачається використовувати результати, ОІВ	Заплановані обсяги впровадження
Флуориметричний ензиматично-хімічний аналітичний набір для одночасного визначення вмісту L-аргініну та L-цитруліну в крові	Інститут біології клітини НАН України, м. Львів, Україна; Львівський медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна	1000 наборів на рік

18.2 Шляхи та способи подальшого використання в суспільній практиці результатів виконання науково-технічного проєкту

Враховуючи необхідність простого та ефективного методу одночасного визначення вмісту аргініну і цитруліну у різних галузях медицини та промисловості, ринок України виглядає досить перспективним. Завдяки використанню простих та дешевих компонентів, собівартість продуктів буде невисокою, відповідно, кінцева ціна тест-системи може бути нижчою у декілька разів у порівнянні з існуючими зарубіжними комерційними аналогами. За умови успішного проходження зовнішнього випробування, науковою групою буде подано заявку на реєстрацію товарного знаку України і пошук фірм - можливих виробників серійних партій біоаналітичного продукту. Зокрема, планується налагодити тіснішу співпрацю із ТзОВ «Дезомарк», який має досвід впровадження власних розробок компаній у серійне виробництво. Паралельно буде вестись пошук іноземних компаній-виробників аналітичних продуктів з метою випуску та впровадження розробленої тест-системи за межами України.

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	Аналітичний набір для одночасного визначення вмісту L-аргініну та L-цитруліну в крові	500 наборів
Україна	Кафедра імунології та алергології Львівського національного університету імені Данила Галицького	Аналітичний набір для одночасного визначення вмісту L-аргініну та L-цитруліну в крові	500 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
Патент України на корисну модель №107543. u201512716. – вид. 10.06.2016. Бюл. №11. – С. 1-5.	Ензиматичний метод визначення вмісту L-аргініну в крові людини	Інститут біології клітини НАН України. Автори: Стасюк, Г.З. Гайда, А.Є. Закальський, О.М. Закальська, М.В. Гончар	Виключні майнові права
Патент України на корисну модель №108773. u201601804. – вид. 25.07.2016. Бюл. №14. С. 1-7.	Ензиматично-хімічний метод визначення вмісту L-аргініну в харчових продуктах та алкогольних напоях	Інститут біології клітини НАН України. Автори: Г.З. Гайда, Н.Є. Стасюк, Ю.Р. Борецький, Л.Р. Фаюра, А.А. Сибірний, М.В. Гончар	Виключні майнові права
Пат. 66335 Україна, № u201109203; опубл. 26.12.2011, бюл. № 24.	Поліпшений спосіб одержання аргініндезмінази <i>Mycoplasma hominis</i> із рекомбінантних штамів бактерій <i>Escherichia coli</i> .	Інститут біології клітини НАН України. Автори: А.А. Сибірний, Л.Р. Фаюра, В.Ю. Борецький	Виключні майнові права

20. Фінансові аспекти науково-технічного проєкту

20.1. Загальна вартість роботи 300,000 тис. грн.

словами: *триста тисяч грн.*

20.2. Вартість роботи:

Роки виконання роботи	2021 р.
Вартість виконання робіт (тис. грн.)	300,000

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

Наукова рада Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ); Наукова рада біологічного факультету Львівського національного університету ім. Івана Франка (м. Львів)

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

Прізвище, ім'я, по батькові	Науковий ступінь, посада	Місце роботи
Солдаткін Олексій Петрович	академік НАН України, д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т молекулярної біології і генетики НАН України
Дробот Людмила Борисівна	д.б.н., проф., завідувач відділу	Ін-т біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
Федоренко Віктор Олександрович	д.б.н., проф., завідувач кафедри	Львівський національний університет імені Івана Франка

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

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

24. Організація(ї)-партнер(и) (найменування, місцезнаходження, номери телефонів)

№	Найменування	Місцезнаходження	Номери телефонів
0	ТзОВ "ДезоМарк"	79026, м.Львівм. Львів, Акад. Лазаренка 6- Б	(032)227-61-22

25. Форма участі партнера у проєкті (відмітити необхідні і конкретизувати по окремих пунктах)

№	Форма участі	Назва матеріальної участі, послуги та фінансовий еквівалент
0.	ТзОВ "ДезоМарк"	
<input type="checkbox"/>	Фінансова	Обсяг фінансування _____ тис. грн.
<input type="checkbox"/>	Матеріальна	Загальний фінансовий еквівалент _____ тис. грн.
<input checked="" type="checkbox"/>	Послуги	1.Забезпечення реактивами та допоміжними матеріалами. Консультування з питань оформлення Науково-технічної документації на біоаналітичний набір та його реєстрації згідно вимог чинного законодавства. Загальний фінансовий еквівалент 150.000 тис. грн. _____ 2.Консультування з проведення тестування створеного біоаналітичного набору на біологічних рідинах людини. Консультування з питань оформлення Науково-технічної документації на біоаналітичний набір та його реєстрації згідно вимог чинного законодавства. Загальний фінансовий еквівалент 150.000 тис. грн. _____ Загальний фінансовий еквівалент 300.000 тис. грн.
		Загальний фінансовий еквівалент 300,000 тис. грн.
		Загальний фінансовий еквівалент 300,000 тис. грн.

26. Час і місце впровадження розробки за проєктом

н е м а є

дата

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ А.А. Сибірний

(підпис)

М.П.

Науковий керівник науково-технічного
проєкту

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

_____ М.В. Гончар

(підпис)

*Додаток А
до Запиту на відкриття науково-технічного проєкту*

ПОГОДЖЕНО

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ А.А. Сибірний
(підпис)
« _____ » _____ 20__ р.
М.П.

ТЕХНІЧНЕ ЗАВДАННЯ на виконання науково-технічного проєкту

**«Створення біоаналітичного набору для аналізу аргініну та цитруліну в біологічних
рідинах»
Науково-технічні проєкти установ НАН України 2021 року**

Інститут біології клітини НАН України

1. Рішення про затвердження науково-технічного проєкту

2. Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки

Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

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

Технології створення молекулярно-діагностичних систем та терапевтичних засобів, ферментних та бактеріальних препаратів

Молекулярні біотехнології створення нових організмів та продуктів для сільського господарства, фармацевтичної та харчової промисловості

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)

н е м а є

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 науково-технічного проєкту

Метою даного проєкту є доопрацювання створеного нами нового флуориметричного ензиматично-хімічного методу одночасного аналізу вмісту L-аргініну та L-цитруліну, розробка ензиматичного набору для аналізу вказаних метаболітів у біологічних рідинах людини, виготовлення пробної серії аналітичного набору та підготовка науково-технічної документації на набір (інструкція та лабораторний регламент виготовлення).

7. Термін проведення науково-технічного проєкту

початок — 01 січня 2021 р. ; закінчення — 31 грудня 2021 р.

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому **300,000** тис. грн.

та по роках

2021 р. — 300,000 тис. грн.

8. Календарний план науково-технічного проєкту

№ з/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання	Відповідальний виконавець
1	Доопрацювання флуориметричного ензиматично-хімічного методу визначення вмісту L-аргініну та L-цитруліну на основі рекомбінантної аргінідеїмінази.	02 січня 2021 р. - 31 березня 2021 р.	к.х.н., Н.Є. Стасюк.
2	Тестування розробленого методу аналізу аргініну і цитруліну в біологічних рідинах людини	01 квітня 2021 р. - 30 червня 2021 р.	к.х.н., с.н.с., Г.З. Гайда.
3	Створення біоаналітичного ензиматичного набору для аналізу L-аргініну та L-цитруліну.	01 липня 2021 р. - 30 вересня 2021 р.	д.б.н., проф., М.В. Гончар.

4	Оптимізація складу набору та підготовка науково-технічної документації на біоаналітичний набір (Інструкція, лабораторний регламент виготовлення).	01 жовтня 2021 р. - 30 грудня 2021 р.	к.б.н., Л.Р. Фаюра.
---	---	--	------------------------

9. Зміст, основні вимоги до виконання науково-технічного проєкту, рівня і способів її виконання

Основна ідея проєкту полягає в доопрацюванні нового флуориметричного ензиматично-хімічного методу одночасного аналізу L-аргініну та L-цитруліну в крові, тестуванні запропонованого методу, створення та виготовлення пробної серії відповідного біоаналітичного набору, а також розробка науково-технічної документації на аналітичний продукт.

В основі попередньо запропонованих нами ензиматичних методів аналізу аргініну в крові (сироватці та плазмі, попередньо очищеної від білків) лежить застосування препаратів термостабільної аргінази, яка була одержана за допомогою сконструюваних нами штамів-надпродуцентів та очищена за власними технологіями. Вміст аргініну оцінювали за рівнем утвореної під дією аргінази сечовини, яку детектували за допомогою реакції з 2,3-бутандіонмонооксимом (ДМО) та утвореним флуоресцентним продуктом. Перед додаванням аргінази, зразки обробляли уреазою, усуваючи, таким чином, вплив ендогенної сечовини на результати аналізу. Запропонований в попередніх дослідженнях метод визначення вмісту аргініну за використанні аргініндеїмінази та орто-фталевого альдегіду має деякі недоліки, оскільки застосування ОФА потребує чистого повітря в лабораторії для запобігання впливу на результат аналізу присутності аміаку.

На сьогодні, скринінгові тест-системи для моніторингу вмісту аргініну та цитруліну в біологічних рідинах, зокрема у крові, відсутні в арсеналі вітчизняної клінічної діагностики. Отже, розробка зручних у використанні, відносно недорогих, селективних та високочутливих ензиматичних методів для одночасного визначення вмісту аргініну та цитруліну в біологічних зразках становить значний прикладний інтерес для використання у наукових дослідженнях, у діагностичних лабораторіях, ветеринарії, харчовій промисловості, а також у клінічній практиці.

У рамках проєкту, буде доопрацьовано новий флуориметричний ензиматично-хімічний метод одночасного аналізу вмісту аргініну та цитруліну на основі рекомбінантної аргініндеїмінази та проведено тестування цього методу на біологічних рідинах людини. Варто підкреслити, що в Інституті біології клітини НАН України сконструйовано рекомбінантний надпродуцент аргініндеїмінази та розроблено технологію виділення високоочищеного стабільного препарату вказаного ензиму, що дозволяє уникнути закупівлі дорогих зарубіжних ензимів для виробництва діагностичних тест-систем.

Для виконання завдань проєкту планується здійснити наступні дослідження:

1. Доопрацювати ензиматично-хімічний метод одночасного аналізу L-аргініну та L-цитруліну на основі рекомбінантної аргініндеїмінази та відповідної флуориметричної детекції продукту реакції;
2. Провести тестування розробленого методу аналізу L-аргініну і L-цитруліну на біологічних рідинах людини.
3. Створити біоаналітичний ензиматичний набір для аналізу L-аргініну та L-цитруліну та підготувати науково-технічну документацію на нього (Інструкція, лабораторний регламент виготовлення).

Пропонована розробка відповідає рівню кращих зарубіжних прототипів і не має аналогів в Україні.

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

У результаті реалізації проєкту буде доопрацьовано новий флуориметричний ензиматично-хімічний метод одночасного аналізу вмісту аргініну та цитруліну на основі рекомбінантної аргініндеїмінази, здійснено тестування запропонованого методу на зразках крові людини, виготовлено пробну серію відповідного біоаналітичного продукту та підготовлено комплект технічної документації (інструкція, лабораторний регламент виготовлення). Результати досліджень буде опубліковано у фахових журналах та оформлено у вигляді наукового звіту. Буде подано матеріали на патент України на корисну модель.

Завдяки використанню простих та дешевих компонентів, собівартість продуктів буде невисокою, відповідно, кінцева ціна тест-системи може бути нижчою у декілька разів у порівнянні з існуючими зарубіжними комерційними аналогами. За умови успішного проходження зовнішнього випробування, науковою групою буде подано заявку на реєстрацію товарного знаку України і пошук фірм - можливих виробників серійних партій біоаналітичного продукту. Зокрема, планується налагодити тіснішу співпрацю із ТзОВ «Дезомарк», який має досвід впровадження власних розробок компаній у серійне виробництво.

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

- звіт про виконання наукового проєкту, оформленого відповідно до ДСТУ 3008:2015 «Інформація та документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура та правила оформлювання» зі списком публікацій за результатами виконання роботи у звітному році;
- кошторис фактичних витрат із розрахунками за статтями;
- перелік статей накладних витрат;
- перелік додаткової науково-технічної документації (за необхідності).

Науковий керівник науково-технічного проєкту

Завідувач відділу

Інституту біології клітини НАН України

д.б.н., проф.

М.В. Гончар

(підпис)

Планова калькуляція кошторисної вартості науково-технічного проекту**«Створення біоаналітичного набору для аналізу аргініну та цитруліну в біологічних рідинах»
на 2021 рік**

Термін виконання науково-технічного проекту: початок — 01.01.2021 р., закінчення — 31.12.2021 р.

№ з/п	Найменування статей витрат	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1	Заробітна плата	2111	150,000
2	Нарахування на оплату праці	2120	33,000
3	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	25,000
4	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	20,000
5	Видатки на відрядження	2250	12,000
6	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	20,000
7	Оплата електроенергії	2273	30,000
8	Оплата природного газу	2274	10,000
Разом:			300,000
в т.ч. накладні витрати			15,000
% їх до основної заробітної плати			10,0%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор
Інституту біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ А.А. Сибірний

(підпис)

М.П.

Науковий керівник науково-технічного проекту
Завідувач відділу
Інституту біології клітини НАН України
д.б.н., проф.

_____ М.В. Гончар

(підпис)

Головний бухгалтер

_____ М.С. Демкович

(підпис)