

ЗАПИТ

на проведення наукової (науково-технічної) роботи

1. Назва роботи

Створення знезаражуючого засобу на основі глюкозооксидази та наноматеріалів

10. Науковий керівник роботи

Сибірний Андрій Андрійович, академік НАН України, д.б.н., проф., директор, Інститут біології клітини НАН України

телефон: +38 032 261 2163; факс: +38 032 261 2148; e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

13. Ключові слова (до 7 слів) глюкозооксидаза, наночастинки, знезараження

14. Резюме

Під час ведення бойових дій однією з найбільш гострих проблем є знезараження ранових поверхонь. Всі рани, без виключення, будучи інфікованими, несуть загрозу виникнення різних ускладнень, часто несумісних з життям пораненого чи хворого. Метою даної НТР є створення унікального вітчизняного препарату, що не має аналогів за кордоном, для знезараження ранових поверхонь, у тому числі, після глибоких проникаючих поранень, а також для прискорення загоєння ран та лікування опіків. Мета роботи буде досягнута шляхом використання штамів дріжджів, що здатні до надпродукції ферменту цвілевих грибів, глюкозооксидази, який постійно утворює пероксид Гідрогену у присутності ендогенного субстрату - глюкози, що присутня у плазмі крові, і тим самим знезаражує ранові поверхні. Глюкозооксидаза буде використана як у чистому вигляді, так і в складі пермеабілізованих клітин дріжджів, що продукують цей гетерологічний фермент. Підвищення стабільності ферменту буде забезпечено шляхом його іммобілізації на поверхні наночастинок різної природи або збагаченням пермеабілізованих клітин продуцента глюкозооксидази цими наночастинками. Буде опрацьовано методи очистки, стабілізації та іммобілізації глюкозооксидази або пермеабілізованих клітин, а також створено композит, що містить глюкозооксидазу та допоміжні компоненти та матеріали. Створений композит буде протестовано для загоєння та знезараження експериментальних шкірних ран на мишачій моделі *in vivo*.

15. Обґрунтування доцільності виконання роботи (до 3 сторінок)

Керуватися наступним планом викладення матеріалу:

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

Розробка нових ефективних методів, що сприяють дезінфекції та загоєнню ран різної етіології, є важливою проблемою сучасної медицини. Актуальність цієї проблеми зростає на порядки за умов ведення активних бойових дій. Для знезараження ран та боротьби з мікробними інфекціями ранової поверхні в основному використовують антибіотики широкого спектру дії, однак у зв'язку з великою кількістю бактерій з множинною стійкістю до антибіотиків, застосування останніх далеко не завжди є успішним (Bharadwaj et al., 2022; Nwobodo et al., 2022). Тому часто, окрім антибіотиків, для обробки ран застосовують різноманітні антисептики, зокрема сполуки, що виділяють йод, хлор або срібло, хлоргексидин, оцтову кислоту та пероксид Гідрогену. Ефективну антибактерійну дію

виявляють також різні джерела реактивних форм Оксигену та Нітрогену (Vatansever et al., 2013). Однак до останнього часу не розроблено ефективних джерел для постійної генерації пероксиду гідрогену та реактивних форм Оксигену безпосередньо на поверхні ран.

У поточному проєкті для створення ефективної ензиматичної системи тривалого утворення пероксид Гідрогену і реактивних форм Оксигену як протимікробних засобів для знезараження ран ми пропонуємо виконання наступних наукових завдань:

1. Сконструювати ефективний продуцент внутрішньоклітинної форми глюкозооксидази на основі дріжджів *Ogataea polymorpha*.
2. Виділити та очистити препарат глюкозооксидази.
3. Стабілізувати препарати глюкозооксидази.
4. Дослідити вплив наночастинок різної природи на активність та стабільність препаратів глюкозооксидази та пермеабілізованих клітин продуцентів цього ферменту.
5. Створити знезаражуючий препарат на основі глюкозооксидази.
6. Дослідити знезаражуючий та загоюючий ефекти препарату на мишах.

Пропонований науковий проєкт поєднує фундаментальні наукові дослідження та інноваційні практичні розробки для вирішення гострої проблеми знезараження ран.

15.2. Стан розроблення проблеми (дати характеристику результатів, отриманих іноземними фахівцями, які здійснюють подібні дослідження; вказати, які вітчизняні фахівці та наукові організації, крім заявників, здійснюють аналогічні дослідження; вказати, хто в світі, а також в країні займає лідируючі позиції з розробки даної проблеми;).

Ранова поверхня є сприятливим середовищем для розмноження мікроорганізмів, у т.ч. патогенних бактерій, дріжджів та грибів. Серед патогенних бактерій зустрічаються як аеробні, так і анаеробні види і штами. Неконтрольоване розмноження мікроорганізмів на поверхні та в глибоких шарах вогнепальних та опікових ран є серйозною загрозою для життя пораненого. Особливу небезпеку спричиняє значна кількість бактерій з множинною резистентністю до більшості, а часом і до всіх відомих на сьогодні антибіотиків. Серед таких бактерій в першу чергу слід відмітити Грам-позитивні метицилін-резистентні штами *Staphylococcus aureus* та Грам-негативні бактерії *Pseudomonas aeruginosa*. Розробка нових ефективних засобів знезараження ран для подолання мікробних інфекцій є одним з головних шляхів зменшення смертності поранених. Саме тому для обробки ран запропоновано використовувати численні антисептики неантибіотичної природи. В основному, це неорганічні або органічні джерела срібла, йоду, хлору, а також деякі органічні сполуки, оцтова кислота, пероксид Гідрогену та реактивні форми Оксигену та Нітрогену (Bowler et al., 2001; Church et al., 2006; Vatansever et al., 2013). Однак більшість перелічених сполук досить токсичні, що обмежує їх застосування. Активним дезінфікуючим засобом є пероксид Гідрогену, однак для тривалої дії слід забезпечити постійну генерацію цього антисептика на рановій поверхні. На нашу думку, найкращим методом для цього є використання оксидаз, одним з продуктів їх дії є власне пероксид Гідрогену. Значна кількість оксидаз продукує також реактивні форми Оксигену (вільні радикали), які, як уже згадувалося, є ефективними антимікробними засобами (Vatansever et al., 2013).

Дослідження в галузі пошуку ефективних протимікробних засобів для знезараження ран проводяться в численних лабораторіях різних країн світу. Одним із напрямків досліджень є пошук та застосування антимікробних пептидів (Bellotti et al., 2022). Стосовно ж використання оксидаз як постійного джерела пероксид Гідрогену та вільних радикалів, можна привести роботу індійських авторів по використанню іммобілізованої на поверхні колагенової матриці глюкозооксидази (Agul et al., 2012). Також описано застосування ксантиноксидоредуктази, що виявляє антибактерійну активність (Martin et al., 2004). Однак продуктом дії ксантиноксидоредуктази, окрім активних форм Оксигену, є сечова кислота, нагромадження якої в ранах гальмує їх загоєння (Fernandez et al., 2014).

Отже, застосування оксидаз для знезараження ран може знайти широке практичне застосування. Водночас, їх застосування у практиці потребує отримання високо стабільних форм ферментів та оптимізації складу допоміжних компонентів та носіїв для отримання ефективного дезінфікуючого медичного засобу. Пропонований проєкт власне спрямований на розв'язання цих проблем. Основною ж метою проєкту є створення вітчизняних знезаражуючих засобів нового покоління.

15.3. Досвід і доробок авторів (ідеї, гіпотези, результати попередніх досліджень, які покладені в основу нової наукової роботи, вказати також основні публікації авторського колективу за проблематикою роботи за останні 5 років).

Автори мають значний багаторічний досвід у галузі молекулярної генетики, біохімії та біотехнології метилотрофних дріжджів, зокрема, *O. polymorpha*. Ще в 1987-1989 рр. вийшли міжнародні публікації, що стосувалися регуляції синтезу алкогольоксидази (Sibirny et al., 1987; Tolstorukov et al., 1989), а також були опрацьовані методи виділення і очистки цього ферменту (Sibirny et al., 1988; Ubiyvovk and Sibirny, 1991). У подальшому, автори ізолювали мутанти з генетичним блоком синтезу алкогольоксидази (Sibirny et al., 1989), а також запатентували мутанти, здатні секретувати цей фермент в середовище (Titorenko et al., 1992). Виділений препарат алкогольоксидази був використаний як основний компонент для розробленого авторами проєкту ензиматичного набору «Алкотест» для аналізу етилового спирту (Gonchar et al., 2001). Ізольовано мутанти, здатні синтезувати значні кількості алкогольоксидази в середовищі з глюкозою без додавання токсичного метанолу (Stasyk et al., 2004; 2008). Було сконструйовано рекомбінантні штами *O. polymorpha*, ефективні продуценти секреторної форми гетерологічної глюкозооксидази цвілевого гриба *Aspergillus niger* (Krasovska et al., 2007).

В останні десятиліття бурхливо розвивається новий напрям інноваційних біотехнологій з використанням наноматеріалів – наноносіїв, нанозимів та наномедіаторів. Наноносії - це новітні наноматеріали, які зв'язують біологічно активні сполуки, тим самим стабілізуючи їх або навіть підсилюючи притаманну їм біологічну активність (Shreyash et al., 2021). Нанозими - це штучні ферменти, високостабільні та недорогі альтернативні каталізатори біохімічних реакцій (Wei & Wang, 2013; Sun et al., 2018; Stasyuk et al., 2020). Серед штучних ферментів, створених останнім часом, можна назвати різноманітні природні та синтетичні матеріали - циклодекстрини, комплекси металів, порфірини, полімери, дендромери, які імітують структуру та функції природних ензимів. Зовсім недавно було виявлено, що деякі наноматеріали теж виявляють каталітичні властивості, цінні для їх практичного використання. Скринінг і скерований синтез таких матеріалів тільки почався, і очікуються привабливі перспективи заміни природних ферментів такими штучними аналогами у практичній біотехнології, у т.ч. для медицини.

Наномедіатори - це зовсім новий термін для позначення функціональних наноматеріалів, які здатні до прискорення електронного переносу між молекулами (Afgreen et al., 2015; Zheng Chen et al., 2022).

Авторами проєкту активно проводяться дослідження, спрямовані на розробку методів синтезу нових наноматеріалів, їх морфологічно-структурній характеристиці, аналізу каталітичної активності. Низка новосинтезованих наноматеріалів використано для іммобілізації ферментів, для каталізу електронного переносу на поверхні біоелектродів, а також для створення ензимо-нанозимних біосенсорів для аналізу практично важливих речовин (див. список публікацій авторів проєкту).

Публікації авторського колективу за останні 5 років (2019-2023)

2019

1. Gayda G.Z., Demkiv O.M., Stasyuk N.Ye., Serkiz R.Y., Gonchar M.V., Nisnevitch M. Metallic nanoparticles obtained via “green” synthesis as a platform for biosensor construction // Appl. Sci. – 2019. – V.9. – P. 720-735. <https://doi.org/10.3390/app9040720> (IF 2.217).

2. Kavetsky T., Smutok O., Demkiv O., Kasetaitė S., Ostrauskaite J., Švajdlenková H., Šauša O., Zubrytska K., Hoivanovych N., Gonchar M. Dependence of operational parameters of laccase-based biosensors on structure of photocross-linked polymers as holding matrixes // *European Polymer Journal*. – 2019. – V. 115. – P. 391-398. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.03.056> (IF 3.621).

3. Smutok O., Karkovska M., Prokopiv T., Kavetsky T., Sibirnyj W., Gonchar M. D-lactate-selective amperometric biosensor based on the mitochondrial fraction of *Ogataea* (*Hansenula*) polymorpha recombinant cells // *Yeast*. – 2019. – V. 36, N 5. – P. 341-348. <https://doi.org/10.1002/yea.3372> (IF 2.395).

4. Stasyuk N.Ye., Gayda G.Z., Zakalskiy A.E., Zakalska O.M., Serkiz R.Y., Gonchar M.V. Amperometric biosensors based on oxidases and Pt/Ru nanoparticles as artificial peroxidase // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 285. – P. 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.117> (IF 5.399).

5. Semkiv M., Kata I., Ternavska O., Sibirny W., Dmytruk K., Sibirny A. Overexpression of the genes of glycerol catabolism and glycerol facilitator improves glycerol conversion to ethanol in the methylotrophic thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. *Yeast*. 2019. Vol. 36, No 5. P. 329 – 339. <https://doi.org/10.1002/yea.3387>. (IF 2.395).

6. Berezka K., Semkiv M., Borbuliak M., Blomqvist J., Linder T., Ruchala J., Dmytruk K., Passoth V., Sibirny A. Insertional tagging of the *Scheffersomyces stipitis* gene *HEM25* involved in regulation of glucose and xylose alcoholic fermentation. *Cell Biology International*. 2019. <https://doi.org/10.1002/cbin.11284>. (IF 2.13).

2020

1. Kavetsky T., Demkiv O., Smutok O., Maľko I., Švajdlenková H., Šauša O., Novák I., Berek D., Čechová K., Pecz M., Nykolaishyn-Dytso O., Wojnarowska-Nowak R., Broda D., Gonchar M. Microporous carbon fibers as electroconductive immobilization matrixes: Effect of their structure on operational parameters of laccase-based amperometric biosensor // *Material Sciences and Engineering C*. - 2020. - V. 109. - 110570. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110570> (IF 4.959).

2. Demkiv O.M., Gayda G.Z., Broda D., Gonchar M.V. Extracellular laccase from *Monilinia fructicola*: isolation, primary characterization and application // *Cell Biol. Intern.* - 2020. <https://doi.org/10.1002/cbin.11316> (IF 2.127).

3. Stasyuk N., Smutok O., Demkiv O., Prokopiv T., Gayda G., Nisnevitch M., Gonchar M. Synthesis, Catalytic Properties and Application in Biosensorics of Nanozymes and Electronanocatalysts: A Review // *Sensors*. – 2020. – V. 20. – 4509 (42 p.). <https://doi.org/10.3390/s20164509> (IF 3.275).

4. Smutok O., Kavetsky T., Prokopiv T., Serkiz R., Wojnarowska-Nowak R., Šauša O., Novák I., Berek D., Melman A., Gonchar M. New micro/nanocomposite with peroxidase-like activity in construction of oxidases based amperometric biosensors for ethanol and glucose analysis // *Analytica Chimica Acta*. - 2021.- V. 1143. – P. 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.052> (IF 5.990).

5. Demkiv O., Stasyuk N., Serkiz R., Gayda G., Nisnevitch M., Gonchar M. Peroxidase-like metal-based nanozymes: synthesis, catalytic properties, and analytical application // *Appl. Sci.* - 2021. - 11, 777 (14 p.). <https://doi.org/10.3390/app11020777>. (IF 2.474).

6. Dmytruk K. V., Ruchala J., Fedorovych D. V., Ostapiv R. D., Sibirny A. A. Modulation of the purine pathway for riboflavin production in flavinogenic recombinant strain of the yeast *Candida famata*. *Biotechnology Journal*. 2020. 22:e1900468. <https://doi.org/10.1002/biot.201900468>. (IF 3.543).

7. Kurylenko O. O., Ruchala J., Dmytruk K. V., Abbas C. A., Sibirny A. A. Multinuclear yeast *Magnusiomyces* (*Dipodascus*, *Endomyces*) *magnusii* is a promising isobutanol producer. *Biotechnology Journal*. 2020. 28:e1900490. <https://doi.org/10.1002/biot.201900490>. (IF 3.543).

2021

1. Gayda G.Z., Demkiv O.M., Gurianov Y., Serkiz R.Y., Klepach H.M., Gonchar M.V., Nisnevitch M. “Green” Prussian Blue Analogues as Peroxidase Mimetics for Amperometric Sensing and Biosensing // *Biosensors*. – 2021. – V. 11, 193. <https://doi.org/10.3390/bios11060193> (IF 5.519).

2. Smutok O., Kavetsky T., Prokopiv T., Serkiz R., Wojnarowska-Nowak R., Šauša O., Novák I., Berek D., Melman A., Gonchar M. New micro/nanocomposite with peroxidase-like activity in construction of oxidases based amperometric biosensors for ethanol and glucose analysis // *Anal. Chim. Acta*. – 2021. – V. 1143. – P. 201-209. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.11.052> (IF 6.558).

3. Smutok O., Kavetsky T., Gonchar M., Katz E. Microbial L- and D-Lactate Selective Oxidoreductases as a Very Prospective but Still Uncommon Tool in Commercial Biosensors // *ChemElectroChem*. – 2021. – V. 8, P. 1–8. <https://doi.org/10.1002/celec.202101149> (IF 4.590).

4. Stasyuk N.Ye., Gayda G.Z., Zakalskiy A.E., Fayura L.R., Zakalska O.M., Sibirny A.A., Nisnevitch M., Gonchar M.V. Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn(Hg) S nanoparticles // *Talanta*. – 2022. – V. 238, 122996, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122996> (IF 6.057).

5. Demkiv O., Stasyuk N., Gayda G., Gonchar M. Highly sensitive amperometric sensor based on laccase-mimicking metal-based hybrid nanozymes for adrenaline analysis in pharmaceuticals // *Catalysts*. – 2021. – V. 11 (12), 1510; <https://doi.org/10.3390/catal11121510> (IF 4.146).

6. Kurylenko O, Ruchala J, Kruk B, Vasylyshyn R, Szczepaniak J, Dmytruk K, Sibirny A. The role of Mig1, Mig2, Tup1 and Hap4 transcription factors in regulation of xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. FEMS Yeast Res. 2021 18;21(4):foab029. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab029> (IF 2.796).

7. Dzanaeva L, Kruk B, Ruchala J, Sibirny A, Dmytruk K. The impact of transcription factors Znf1, Sip4, Adr1, Tup1, and Hap4 on xylose alcoholic fermentation in the engineered yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie Van Leeuwenhoek. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01607-6> (IF 1.934).

2022

1. Stasyuk N., Demkiv O., Gayda G., Zakalskiy A., Klepach H., Bisko N., Gonchar M. and Nisnevitch M. Highly Porous 3D Gold Enhances Sensitivity of Amperometric Biosensors Based on Oxidases and CuCe Nanoparticles. Biosensors. 2022. Vol. 12. P. 472. <https://doi.org/10.3390/bios12070472> (IF 5.743).

2. Stasyuk N. Ye., Gayda G.Z., Zakalskiy A.E., Fayura L.R., Zakalska O.M., Sibirny A.A., Nisnevitch M., Gonchar M.V. Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn(Hg)S nanoparticles. Talanta. 2022. Vol. 238, No 1. P. 122996. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122996> (IF 6.057).

3. Gayda G., Stasyuk N., Zakalskiy A., Gonchar M., Katz E. Arginine-hydrolyzing enzymes for electrochemical biosensors. Current Opin. Electrochem. 2022. Vol. 33. P. 100941, <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2022.100941> (IF 7.271).

4. Demkiv O., Gayda G., Stasyuk N., Brahinetz O., Gonchar M., Nisnevitch M. Nanomaterials as Redox Mediators in Laccase-Based Amperometric Biosensors for Catechol Assay. Biosensors. 2022. Vol. 12. P. 41. <https://doi.org/10.3390/bios12090741> (IF 5.743).

5. Stasyuk N., Demkiv O., Gayda G., Zakalska O., Zakalskiy A., Serkiz R., Kavetskiy T., Gonchar M. Reusable alcohol oxidase-nPtCu/alginate beads for highly sensitive ethanol assay in beverages. RSC Adv. 2022. Vol. 12, No 33. P. 21309-21317. <https://doi.org/10.1039/D2RA02106D> (IF 4.04).

6. Kavetskiy T., Smutok O., Demkiv O., Kukhazh Yu., Stasyuk N., Leonenko E., Kiv A., Kobayashi Yo., Kinomura A., Šauša O., Gonchar M., Katz E. Improvement of laccase biosensor characteristics using sulfur-doped TiO₂ nanoparticles // Bioelectrochemistry. – 2022. - Oct;147:108215. Epub 2022 Jul 25. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2022.108215> (IF 5.373).

7. Semkiv MV, Ruchala J, Tsaruk AY, Zazulya AZ, Vasylyshyn RV, Dmytruk OV, Zuo M, Kang Y, Dmytruk KV, Sibirny AA. The role of hexose transporter-like sensor hxs1 and transcription activator involved in carbohydrate sensing azf1 in xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. Microb Cell Fact. 2022; 21(1):162. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01889-z> (IF 5.143).

8. Ruchala J, Andreieva YA, Tsyrlunyk AO, Sobchuk SM, Najdecka A, Wen L, Kang Y, Dmytruk OV, Dmytruk KV, Fedorovych DV, Sibirny AA. Cheese whey supports high riboflavin synthesis by the engineered strains of the flavinogenic yeast *Candida famata*. Microb Cell Fact. 2022; 21(1):161. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01888-0> (IF 5.143).

2023

1. Dmytruk, K., Ruchala, J., Fayura, L., Chrzanowski, G., Dmytruk, O., Tsyrlunyk, A., Andreieva, Y., Fedorovych, D., Motyka, O., Mattanovich, D., Marx, H., Sibirny, A. (2023). Efficient production of bacterial antibiotics aminoriboflavin and roseoflavin in eukaryotic microorganisms, yeasts. *Microbial cell factories*, 22(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02129-8> (IF 6.352).

2. Fedorovych, D., Tsyrlunyk, A., Ruchala, J., Sobchuk, S., Dmytruk, K., Fayura, L., Sibirny, A. (2023). Construction of the advanced flavin mononucleotide producers in the flavinogenic yeast *Candida famata*. *Yeast (Chichester, England)*, 10.1002/yea.3843. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/yea.3843> (IF 3.325).

3. Stasyuk, N., Zakalskiy, A., Nogala, W., Gawinkowski, S., Ratajczyk, T., Bonarowska, M., Demkiv, O., Zakalska, O., Gonchar, M. (2023) A reagentless amperometric biosensor for creatinine assay based on recombinant creatinine deiminase and N-methylhydantoin-sensitive CoCu nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 393: 34276 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134276> (IF 8.4).

4. Prokopiv, T., Stasyuk, N., Gonchar, M. (2023) Nanozyme can substitute a natural *Ogataea polymorpha* catalase enzyme *in vivo*. *Microchimica Acta* 190 (5): 174. <https://doi.org/10.1007/s00604-023-05753-8> (IF 5.7).

5. Demkiv, O., Gayda, G., Stasyuk, N., Moroz, A., Kaušaitė-Minkštienė, A., Gonchar, M., Marina Nisnevitch, M. (2023) Flavocytochrome b₂-Mediated Electroactive Nanoparticles for Developing Amperometric L-Lactate. *Biosensors*. 13(6), 587 <https://doi.org/10.3390/bios13060587> (IF 5.743).

6. Demkiv, O., Nogala, W., Stasyuk, N., Grynychshyn, N., Vus, B., Gonchar, M. (2023) The Peroxidase-like Nanocomposites as Hydrogen Peroxide-Sensitive Elements in Cholesterol Oxidase-Based Biosensors for Cholesterol Assay. *J. Funct. Biomater.* 14(6), 315 <https://doi.org/10.3390/jfb14060315> (IF 4.9).

7. Zazulya AZ, Semkiv MV, Stec M, Cyske Z, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn G, Sibirny AA. The *Komagatella phaffii* ACG1 gene, encoding β-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, is involved in the autophagy of cytosolic and peroxisomal proteins. *Yeast*. 2023 Aug;40(8):367-376. <https://doi.org/10.1002/yea.3846> (IF 3.325).

15.4. Структура досліджень (викласти загальний план та методи досліджень, виділити етапи роботи).

У рамках пропонованого проєкту буде проведено конструювання продуцента внутрішньоклітинної форми глюкозооксидази (ГО) на основі дріжджів *Ogataea polymorpha*. З цією метою буде клоновано ген *GOD Aspergillus niger* під контроль сильного індукованого промотора гена *AOX1*, що кодує алкогольоксидазу. Сконструйована касета експресії у складі плазміди для мультикопійної інтеграції у геном *O. polymorpha* буде використана для отримання відповідних продуцентів. Буде проведено виділення ГО з культурального середовища після культивування раніше сконструйованого продуцента секреторної форми цього ферменту, а також з безклітинних екстрактів новосконструйованих продуцентів внутрішньоклітинної форми ГО. Буде розроблено прості та дешеві методи очистки цих ферментів. Будуть відпрацьовані методи пермеабілізації клітин продуцента ГО. Для зв'язування ГО як бактерицидного агента буде проведено скринінг різних носіїв у мікро- і нанорозмірній формах різної хімічної природи – неорганічних мікро- і наноматеріалів, природних і синтетичних полімерів, а також новітніх нанокompatитних матеріалів (у т.ч., моно- та гібридних наночастинок на основі шляхетних і рідкісних металів). Особливо слід підкреслити іноваційність використання нових нанокompatитних матеріалів – як носіїв ГО у складі бактерицидних матеріалів, що продукуватимуть токсичний для бактерій пероксид Гідрогену у присутності глюкози, так і компонентів, які мають теж сильно виражену бактерицидну дію (наприклад, наночастинок срібла Ag⁰). Для зниження вартості препарату ГО та підвищення стабільності ферменту буде використано пермеабілізовані клітин продуцента ГО, збагачені наночастинками.

Препарати ГО та пермеабілізованих клітин буде використано в складі композицій у вигляді кремів або гідрогелів. Буде визначено оптимальні співвідношення ГО у складі нанокompatитних матеріалів, доцільність додаткового внесення до складу композицій H₂O₂-генеруючих субстратів ГО (глюкози або її неметаболізувального аналога, 2-дезоксиглюкози) та/або сполук, здатних ампліфікувати ROS форми (наприклад, які індукують реакцію Фентона у присутності ГО). Буде відпрацьовано склад основи композиції, що включатиме в себе емульгатори (цетиловий, стеариловий спирти), наповнювачі (парафін, вазелін, гліцерин), сурфактанти (додецилсульфат натрію, лаурилсульфат натрію), консерванти (метилгідроксibenзоат, пропілгідроксibenзоат) та солі, що здатні забезпечувати буферну силу.

Виконання запланованого проєкту буде здійснено у шість етапів:

1. Конструювання ефективного продуцента внутрішньоклітинної форми ГО на основі дріжджів *Ogataea polymorpha* (Конструювання плазміди для мультикопійної інтеграції, що містить ген *GOD A. niger* під контролем сильного індукованого промотора, отримання відповідних дріжджових трансформантів та їх генетичний аналіз).
2. Виділення та очистка препарату ГО (Очистка рекомбінантної секретованої грибною ГО *A. niger* у дріжджового продуцента *O. polymorpha*).
3. Стабілізація препарату ГО та пермеабілізованих клітин продуцентів цього ферменту (Дослідження функціональних параметрів ліофілізованих препаратів рекомбінантної ГО та пермеабілізованих клітин у порівнянні із комерційними препаратами).
4. Дослідження впливу наночастинок різної природи на активність та стабільність препаратів ГО та пермеабілізованих клітин продуцентів цього ферменту.
5. Створення дезінфікуючого препарату на основі ГО (Оптимізація співвідношення стабільного препарату ГО та пермеабілізованих клітин та субстрату, відпрацювання складу основи композиції).
6. Дослідження незаражуючого та загоюючого ефектів препарату на мишах (Використання різних форм шкірних ран, аналіз незаражуючого ефекту після внесення сторонньої мікрофлори у рани тварин).

15.5. Наявність матеріально-технічної бази для виконання роботи.

Інститут біології клітини НАН України має матеріальне і апаратне забезпечення для культивування клітин мікроорганізмів (культуральні середовища, стерильні бокси, автоклави, термостати, термостатовані струшувачі, дезінтегратори, центрифуги «Sorvall», «Eppendorf», ліофілізатор «Christ alpha 1-2 LDplus»); для виділення, очищення ферментів і дослідження їх фізико-хімічних і кінетичних характеристик (хроматографічні колонки, сорбенти, прилади для вертикального електрофорезу білків VE-2М «Хелікон», перистальтичні помпи, колектори фракцій, холодильники,); для синтезу та характеристики мікро- та наночастинок (атомно-силовий мікроскоп «Solver P47-PRO (NT-MDT)», сканувальний електронний мікроскоп «SEM-microanalyser REMMA-102-02» трансмісійний електронний мікроскоп «PEM-100», флуоресцентний мікроскоп «Axio Lab. A1», оптичні мікроскопи, спектрофотометр «SHIMADZU UV-1650», флуориметр «Quantech filter».

Література:

- Afreen S., Muthoosamy K., Manickam S., Hashim U. Functionalized fullerene (C60) as a potential nanomediator in the fabrication of highly sensitive biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015, 6,354 - 364.
- Arul V, Masilamani JG, Jesudason EP, Jaji PJ, Inayathullah M, Dicky John DG, Vignesh S, Jayakumar R. Glucose oxidase incorporated collagen matrices for dermal wound repair in diabetic rat models: a biochemical study. *J Biomater Appl*. 2012, 26(8):917-38.
- Bellotti D, Remelli M. Lights and Shadows on the Therapeutic Use of Antimicrobial Peptides. *Molecules*. 2022; 27(14):4584.
- Bharadwaj A, Rastogi A, Pandey S, Gupta S, Sohail JS. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. *Biomed Res Int*. 2022; 2022:5419874.
- Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001, 14(2):244-69.
- Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Bum wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006, 19(2):403-34.
- Fernandez ML, Upton Z, Shooter GK. Uric acid and xanthine oxidoreductase in wound healing. *Curr Rheumatol Rep*. 2014, 16(2):396.
- Gonchar MV, Maidan MM, Pavlishko HM, Sibimy AA. A new oxidase-peroxidase kit for ethanol assays in alcoholic beverages. *Food. Technol. Biotechnol*. 2001, 39:37-42.
- Krasovska OS, Stasyk OG, Nahomy VO, Stasyk OV, Granovski N, Kordium VA, Vozianov OF, Sibimy AA. Glucose-induced production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* mutants deficient in catabolite repression. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(4):858-70.
- Martin HM, Hancock JT, Salisbury V, Harrison R. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infect Immun*. 2004, 72(9):4933-9.
- Nwobodo D, Ugwu MC, Oliseloke Anie C, Al-Ouqaili MTS, Chinedu Ikem J, Victor Chigozie U, Saki M. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *J Clin Lab Anal*. 2022; 36(9):e24655.
- Pöppel AK, Vogel H, Wiesner J, Vilcinskis A. Antimicrobial peptides expressed in medicinal maggots of the blow fly *Lucilia sericata* show combinatorial activity against bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015, 9. pii: AAC.05180-14.
- Shreyash N., Sonker M., Bajpai S., Tiwary S. Review of the Mechanism of Nanocarriers and Technological Developments in the Field of Nanoparticles for Applications in Cancer Theragnostics. *ACS Appl. Bio Mater*. 2021, 4, 3, 2307-2334.
- Sibirny AA, Titorenko VI, Efremov BD, Tolstorukov II. Multiplicity of mechanisms of carbon catabolite repression involved in the synthesis of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pinus*. *Yeast*, 1987, 3:233-241.
- Sibirny AA, Ubiyvovk VM, Ksheminskaya GP. Peroxidative oxidation of methanol by alcohol oxidase of methylotrophic yeast. *Biokhimiya*, 1988, 53:936-944.
- Sibirny AA, Vitvitskaya OP, Kulachkovsky AR, Ubiyvovk VM. Selection and properties of the mutants of *Hansenula polymorpha* yeast deficient in alcohol oxidase. *Mikrobiologiya*, 1989, 58:751-759.
- Stasyk OG, Maidan MM, Stasyk OV, Van Dijk P, Thevelein JM, Sibimy AA. Identification of hexose transporter-like sensor *HXS1* and functional hexose transporter *HXT1* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Eukaryot Cell* 2008, 7:735-746.
- Stasyk OV, Stasyk OG, Komduur J, Veenhuis M, Cregg JM, Sibimy AA. A hexose transporter homologue controls glucose repression in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem*. 2004, 279:8116-8125.
- Stasyuk N., Smutok O., Demkiv O., Prokopiv T., Gayda G., Nisnevitch M., Gonchar M. Synthesis, catalytic properties and application in biosensors of nanozymes and electronanocatalysts: A Review. *Sensors*. 2020, 20, 4509 (42 p.).
- Sun H., Zhou Y., Ren J., Qu X. Carbon Nanozymes: Enzymatic Properties, Catalytic Mechanism, and Applications. *Angewandte Chemie (Intem. ed. in Eng.)*. 2018, 57(30), 9224-9237.
- Titorenko VI, Sapozhenkova EY, Sibimy AA. Strain of the yeast *Pichia pinus*, the producer of alcohol oxidase. 1992, USSR Author's Certificate, No. 1770357.
- Tolstorukov II, Efremov BD, Benevolensky SV, Titorenko VI, Sibimy AA. Mutants of methylotrophic yeast *Pichia pinus* defective in C2 metabolism. *Yeast*, 1989, 5:179-186.
- Ubiyvovk VM, Sibimy AA. Biochemical study of the mutants of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* with decreased content of FAD in alcohol oxidase. *Biokhimiya*, 1991, 56:2218-2226.

- Vatansever F, de Melo WC, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, Chandran R, Karimi M, Parizotto NA, Yin R, Tegos GP, Hamblin MR. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013, 37(6):955-89.
- Wei H., Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes // *Chem. Soc. Rev.* - 2013. - V. 42, N 14. - P. 6060-6093.
- Zheng Chen *et al.* Modular configurations of living biomaterials incorporating nano-based artificial mediators and synthetic biology to improve bioelectrocatalytic performance: A review. *Science of The Total Environment.* 2022, 824, 153857.

16. Техніко-економічне обґрунтування

Актуальність запланованих досліджень пов'язана з потребою в розробці ефективних і водночас недорогих дезінфікуючих засобів для знезараження ранових поверхонь, у тому числі після глибоких проникаючих поранень, а також для прискорення загоєння ран та лікування опіків. Соціально-економічна значимість результатів запланованої роботи полягає у потребі використання недорогих, стабільних та ефективних ферментних систем на основі глюкозооксидази для постійної генерації пероксиду Гідрогену, що має потужний знезаражуючий ефект. Здешевлення та підвищення стабільності препарату глюкозооксидази досягатиметься використанням пермеабілізованих клітин унікальних штамів дріжджів *O. polymorpha* надпродуцентів внутрішньоклітинної форми цільового ферменту у поєднанні із наночастинками. Застосування наночастинок буде сприяти підвищенню ензиматичної активності та додаткової стабілізації ферменту.

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

Розробка нового знезаражуючого препарату стане науковою основою для створення дешевих дезінфікуючих пов'язок для ефективного знезараження ран. Розроблена технологія виготовлення дезінфікуючого препарату дозволить створювати знезаражуючі пов'язки з використанням інших ферментів, чи клітин мікроорганізмів, надпродуцентів цільових білків. Створення нових композицій на основі препарату ГО, пермеабілізованих клітин та наноматеріалів дозволить здешевити та підвищити дезінфікуючу активність пов'язок.

6. Мета роботи Метою НТР є створення унікального вітчизняного препарату, що не має аналогів за кордоном, для знезараження ранових поверхонь, у тому числі після глибоких проникаючих поранень, а також для прискорення загоєння ран та лікування опіків. Мета роботи буде досягнута шляхом використання штамів дріжджів, що здатні до надпродукції грибного ферменту, глюкозооксидази, який постійно генерує пероксид Гідрогену у присутності ендогенного субстрату - глюкози, що присутня у плазмі крові, і тим самим знезаражує ранові поверхні.

7. Термін проведення роботи: початок – 1 січня 2024; закінчення – 31 грудня 2024

Орієнтовний обсяг коштів на виконання роботи в цілому 4500 тис. грн.
2024 р. 4500 тис. грн.

8. Календарний план роботи (для комплексних робіт - також по розділах роботи)

№ п/п	Найменування основного етапу роботи	Термін виконання початок - закінчення (місяць, рік)	Відповідальний виконавець
-------	-------------------------------------	---	---------------------------

1	Конструювання ефективного продуцента внутрішньоклітинної форми ГО на основі дріжджів <i>Ogataea polymorpha</i>	1 січня 2024 – 31 березня 2024	Дмитрук К.В.
2	Виділення та очистка препарату ГО	1 квітня 2024 – 31 травня 2024	Стасик О.В.
3	Стабілізація препарату ГО та пермеабілізованих клітин продуцентів цього ферменту	30 червня 2024 – 31 липня 2024	Гончар М.В.
4	Дослідження впливу наночастинок різної природи на активність та стабільність препаратів ГО та пермеабілізованих клітин продуцентів цього ферменту.	1 липня 2024 – 31 грудня 2024	Гончар М.В.
5	Створення знезаражуючого препарату на основі ГО	1 липня 2024 – 31 грудня 2024	Гончар М.В. Манько Н.О.
6	Дослідження знезаражуючого та загоюючого ефектів препарату на мишах	1 серпня 2024 – 31 грудня 2024	Стасик О.В. Манько Н.О.

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

Планується створення нового знезаражуючого препарату, принцип дії якого базується на ефективному функціонуванні ензиматичної системи тривалого утворення пероксиду Гідрогену і реактивних форм Оксигену як протимікробних засобів для знезараження ран. Як ензиматичний препарат буде використано стабільні форми очищеного препарату глюкозооксидази або пермеабілізовані клітини дріжджів – надпродуцентів внутрішньоклітинної форми ферменту. Застосування наночастинок різної природи відкриває можливість підвищення ферментативної активності препаратів та їх стабілізації. Кінцевим продуктом даного проєкту буде лабораторний прототип ефективного та дешевого дезінфікуючого препарату. Для проведення більшості наукових досліджень будуть залучені студенти та молоді вчені. Таким чином, пропонований проєкт матиме також соціально-виховний вплив та формуватиме сприятливі умов для набуття молоддю наукового-практичного досвіду та кар'єрного росту.

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

Буде здійснено конструювання дріжджового продуцента внутрішньоклітинної форми глюкозооксидази за допомогою множинної інтеграції еспресійного модуля, що містить ген *GOD A. niger* під контролем промотора і термінатора гена *AOX*, що кодує алкогольоксидазу. Буде проведено генетичний та біохімічний аналіз отриманих трансформантів. На основі використання попередньо сконструйованого дріжджового продуцента секретованої глюкозооксидази буде опрацьовано прості методи очистки рекомбінантного ферменту з культурального середовища. Буде стабілізовано очищений препарат глюкозооксидази та опрацьовано способи пермеабілізації дріжджового продуцента внутрішньоклітинної форми ферменту. Вивчатимуться функціональні параметри ліофілізованих препаратів рекомбінантної глюкозооксидази та пермеабілізованих клітин у порівнянні із комерційними препаратами. Буде проведено скринінг наночастинок різної природи за ознакою підвищення активності та стабільності препаратів глюкозооксидази або пермеабілізованих клітин продуцентів цього ферменту. Буде створено лабораторний прототип дезінфікуючого препарату на основі глюкозооксидази шляхом оптимізації співвідношення стабільного ферменту та пермеабілізованих клітин та

субстрату. Особливу увагу буде приділено відпрацюванню складу основи композиції дезінфікуючого препарату. Створений препарат буде використано для загоєння та знезараження шкірних ран на мишачій моделі in vivo.

Планова калькуляція кошторисної вартості наукової роботи

Створення знезаражуючого засобу на основі глюкозооксидази та наноматеріалів

(назва роботи)

Термін виконання роботи: початок – «01» січня 2024 р., закінчення – «31» грудня 2024 р.

№ з/п	Найменування статей витрат *	КЕКВ	Сума, тис. грн.
1.	Заробітна плата	2111	2540,000
2.	Нарахування на оплату праці	2120	558,800
3.	Предмети, матеріали, обладнання та інвентар	2210	141,200
4.	Оплата послуг (крім комунальних)	2240	10,000
5.	Видатки на відрядження	2250	5,000
6.	Оплата водопостачання та водовідведення	2272	50,000
7.	Оплата електроенергії	2273	500,000
8.	Оплата природного газу	2274	695,000
Разом:			4500,000
в т.ч. накладні витрати			508,000
% їх до основної заробітної плати			20%

УСТАНОВА-ВИКОНАВЕЦЬ:

Директор Інституту
біології клітини НАН України
академік НАН України

_____ Андрій СИБІРНИЙ
(підпис) М.П.
Науковий керівник роботи

_____ Андрій СИБІРНИЙ
(підпис)
Головний бухгалтер

_____ Мирослава ДЕМКОВИЧ
(підпис)