

РЕЦЕНЗІЯ
на монографію О. П. Демченка
«Вступ до флуоресцентної сенсорики»
(«Introduction to Fluorescence Sensing»,
Springer-Verlag, 2009, 586 p.)

Поряд з монографіями і підручниками, присвяченими традиційним класичним фундаментальним наукам, світова наукова громадськість виявляє дедалі більший інтерес до оперативних, широко інформаційних, довідкових та аналітичних матеріалів з переднього краю досліджень у галузі теорії, методології і практики. У монографії Олександра Петровича Демченка «Вступ до флуоресцентної сенсорики» (586 с.), виданої в 2009 р. видавництвом Springer-Verlag, подано узагальнений аналіз сучасної літератури та власних здобутків автора щодо флуоресцентних сенсорних технологій і їх застосувань (близько 2 000 джерел). В анотації до видання зазначено, що флуоресцентна сенсорика — це галузь науки і технології, яка швидко розвивається. Об'єктом її дослідження є практично весь світ природних і синтетичних сполук, що мають бути визначені в різних середовищах, включаючи організм людини. Сфера її застосувань широка — від контролю довкілля до клінічної діагностики. Серед різних методів детектування флуоресцентні методи відзначаються найвищою чутливістю, високою роздільною здатністю в часі та просторі, а також багатогранністю, що дозволяє проводити не лише аналіз різних речовин, а й відображати картину розподілу їх у живих клітинах. Основний механізм сенсування — це перетворення сигналів, що виникають під час молекулярних взаємодій аналітів з флуоресцентними молекулами, наночастинками та нанокомпозитами, з детектуванням цих сигналів за допомогою приладів, які базуються на сучасній електроніці й оптиці.

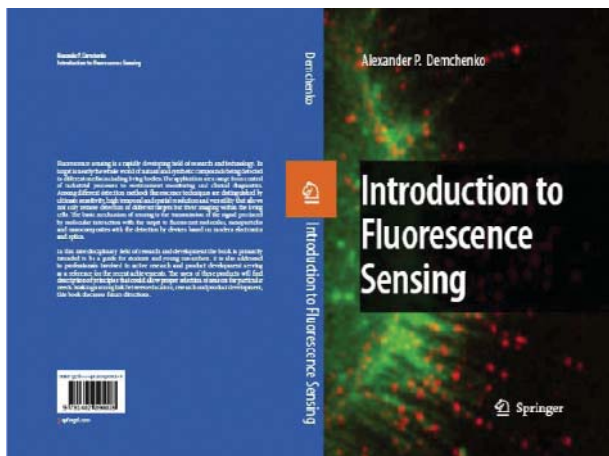
У цій міждисциплінарній галузі досліджень і розробок аналізована монографія передусім спрямована на те, щоб бути дороговказом для студентів і молодих дослідників. Вона також адресована професіоналам, які займаються активними сучасними дослідженнями і розробленням нової продукції, і може слугувати для них довідниковим матеріалом і джерелом інформації про останні досягнення. Користувачі цієї продукції знайдуть в ній виклад основних принципів, що дозволить їм зробити правильний вибір сенсорів для практичних потреб. Створюючи тісний зв'язок між освітою, дослідженнями та розробками нової

продукції, книга водночас привертає увагу і до перспектив майбутнього.

Автор монографії палко доводить, що майбутню належить аналітичним сенсорним пристроям на базі явища флуоресценції, і хоче надихнути своїм ентузіазмом читачів. Написанню та виданню монографії передувала довготривала плідна робота в цій галузі, що й обумовило видання першого і єдиного на цей час у світовій літературі всеосяжного джерела інформації з даного напрямку. Максимальною мірою тут використано досягнення українських учених, а також власної наукової школи та викладено нові наукові ідеї. Пріоритетні широко відомі дослідження О. П. Демченка полягають у розробленні нових підходів до радикального поліпшення властивостей флуоресцентних зондів шляхом спрямованого синтезу нових органічних барвників, створенню нових методів аналізу їх флуоресцентної відповіді, розробленню технології включення їх у наноструктури. Зосередившись на фотохімічних перетвореннях 3-гідроксихромонів і дослідивши їхні унікальні властивості, автор знайшов можливість використати їх як молекулярні зонди, одержав кількісну характеристику таких параметрів, як гідратація і полярність. Для цього було розроблено спеціальний алгоритм, що дозволив проводити глобальний аналіз спектрів збудження і випромінювання. Це дало змогу провести поглиблений аналіз взаємодії альбуміну сироватки крові з метою створення надчутливого тесту на альбумін у сечі для клінічної практики. Розроблені методи одержання флуоресцентної відповіді було застосовано для аналізу нанофібрил- α -синуклеїну, протеїну, що утворюється в клітинах мозку при хворобі Паркінсона, й характеристики агрегатів, що утворюються за чотирьох різних патологічних форм цього протеїну. Передбачається перспектива надзвичайно широкого застосування цих результатів у наносенсорних технологіях. Наукові напрацювання Олександра Петровича втілились у його численних публікаціях у провідних фахових міжнародних виданнях, у тому числі в трьох попередніх монографіях: «Ультрафіолетовая спектроскопия и структура белков» (Київ: Наук. думка, 1981, 208 с.), *Ultraviolet spectroscopy of proteins* (Heidelberg — New York: Springer-Verlag, 1986, 340 p.) та «Люминесценция и динамика белковых структур» (Київ: Наук. думка, 1988, 280 с.).

Оригінальною особливістю рецензованої книги, яка складається з 12 розділів, є те, що наприкінці кожного розділу в стислому резю-

ме (Sensing and Thinking) подається його короткий огляд з викладенням головної ідеї змісту і запрошенням до обговорення теми, її критичного осмислення та заочної дискусії. Закінчується розділ переліком питань та проблем (Questions and Problems), пов'язаних із викладеним у ньому матеріалом, що спонукає читача належним чином проаналізувати його, творчо синтезувати окремі складові, аби наблизитися до вирішення цих питань.



Обкладинка монографії О. П. Демченка

У розділі 1 показана роль флуоресцентних сенсорних технологій порівняно з іншими методами одержання відповіді на міжмолекулярні взаємодії, які лежать в основі роботи сенсорів. Це — калориметрія, мікрокантилевери, поверхневий плазмонний резонанс і електрохімічні (основно-відновні) реакції на електроді. Обговорено ті чинники, що зумовлюють якнайширше використання флуоресцентних методів.

Флуоресценція може бути застосована в різних форматах. Найбільш широко використовуються методи, що діють за принципом «сендвіча». Цей принцип найчастіше задіяний в імуносенсорах, а свою назву дістав від того, що в ньому передбачено подвійне пізнавання аналіту. Спочатку він специфічно реагує з іммобілізованим на поверхні неміченим рецептором (сенсором). Згодом інший, мічений рецептор зв'язується з аналітом «проявляючи» цю взаємодію. Після промивання залишається цей потрійний комплекс і відбувається його скачування на спеціальних пристроях — ридерах.

Застосовуються й інші флуоресцентні сенсорні технології. Зокрема в дослідних і практичних методиках з гібридизації ДНК увесь зразок, що містить досліджувану ДНК, мітиться флуоресцентним барвником, а потім після інкубації з іммобілізованою сенсорною ДНК і відмивання проводяться виміри флуоресценції.

Серед методів дослідження у розчинах найпоширенішим є конкурентний. Він полягає в тому, що досліджуваний зразок додається до розчину комплексу із сенсорних молекул і флуоресцентно міченого аналога аналіту. Його конкурентне заміщення аналіту спричинює зміну сигналу флуоресценції.

Далі описано принцип роботи так званого «прямого» аналізу, де флуоресцентний барвник є частиною сенсорної системи і в процесі взаємодії аналіту із сенсором може давати пряму відповідь. На прикладах з літератури і власних досліджень показано переваги цього підходу і його перспективність. Пряма сенсорна відповідь може бути реалізована двома шляхами: участю барвника у взаємодії з аналітом та відповіддю на конфірмаційні зміни у сенсорі під дією зв'язаного аналіту.

У розділі 2 монографії обговорюються теоретичні аспекти роботи сенсорів. Розглянуто методи визначення констант рівноваги і на їхній основі — динамічного діапазону роботи сенсора. Наголошується фундаментальна роль закону дії мас і встановлення динамічної рівноваги в системі аналіт — рецептор. За цих умов динамічний діапазон не може перевищувати 2 порядки концентрацій аналіту. Наведено результати робіт С. О. Бобровника, який розв'язав низку практичних задач, пов'язаних із визначенням ізотерм зв'язування аналіту в умовах малого об'єму зразка, при конкурентному зв'язуванні. Уперше в монографічній літературі цитується його оригінальний метод визначення констант взаємодій шляхом серійних розведень.

Розділ 3 присвячено викладенню фізичних основ основних методів флуоресцентних досліджень. Реєстрація інтенсивності флуоресценції може відбуватися з розгортанням за спектром поглинання і спектром емісії, з часовим розділенням, а також шляхом реєстрації анізотропії випромінювання. Проналізовано характер інформації, що може бути одержана за допомогою кожного з цих методів. З'ясовуються переваги і недоліки виміру інтенсивності флуоресценції і обґрунтовується необхідність застосування внутрішнього контролю. Вибираючи метод реєстрації анізотропії, слід враховувати необхідність збіжності часу життя флуоресценції і характерного часу обертання молекул чи їхніх сегментів, що дають флуоресцентну відповідь. Виміри флуоресценції з високим часовим розділенням можуть бути застосовані у двох випадках: 1) коли аналіт є динамічним гасієм, і тоді час життя скорочується пропорційно його концентрації; 2) коли зв'язана і вільна форма сенсора істотно відрізняються за часом життя.

Цікавою є технологія застосування ексиплексів — комплексів у збудженому стані, що мають значно змінений спектр флуоресценції. Утворення чи розпад ексиплексів може бути використано як сигнал під час зв'язування аналіту. Таку можливість також надає безвипромінювальне перенесення енергії (англ. аббревіатура FRET). Для його реалізації потрібне подвійне мічення флуоресцентними молекулами чи наночастинками. Оскільки ефективність FRET залежить як функція $1/6$ від відстані між ними, то цей метод можна застосовувати у випадках, коли під час зв'язування аналіту конформаційні зміни у сенсорній молекулі спричинюють зміни відстані між барвниками.

Барвники, що під впливом змін міжмолекулярної взаємодії здатні зміщувати спектри збудження та флуоресценції, становлять значний інтерес, оскільки їх застосування не потребує подвійного мічення. Проаналізовано механізми процесів, що відбуваються при електронному збудженні і викликають ці зміни. Наведено приклади застосувань такого підходу.

Найбільш перспективним у цьому сенсі вважають використання барвників, які внаслідок фотофізичного процесу у збудженому стані здатні утворювати нові смуги флуоресценції.

Саме такі властивості притаманні підходу, що його протягом останніх років розробляють О. П. Демченко і колеги. В його основі лежить застосування механізму внутрішньомолекулярного перенесення протона у збудженому стані (англ. аббревіатура ESIPT). Це вимагає розроблення нового класу барвників, у яких ESIPT може бути спряжений із сенсорною дією шляхом флуоресцентної відповіді цих барвників на зміну міжмолекулярних взаємодій.

Конструюванню молекулярних і наноструктурних флуорофорів присвячено розділ 4, в якому йдеться про властивості флуоресцентних барвників. З огляду на сенсорні технології і залежно від характеру застосування їх можна розділити на 2 групи: такі, що підходять лише для мічення, і такі, що дають флуоресцентну відповідь. Особливий інтерес викликають наночастинки зі вкрапленнями молекулами барвників. Їхня надзвичайна яскравість та можливість різних модифікацій поверхні дозволяють створити методи нового покоління не лише для сенсорики, але й побудови зображень для клінічних цілей.

В останній час чільне місце в сенсорних технологіях зайняли квантові точки. Ці напівпровідникові наночастинки характеризуються надто високою яскравістю, дуже широкою смугою збудження і вузьким спектром флуоресценції, положення якого визначається розміром наночастинки. Таким чином, із час-

тинок одного матеріалу, але різного розміру (в інтервалі 2–10 нм) можна створити набір випромінювань для всього видимого спектра.

Певну увагу в 4-му розділі приділено й іншим випромінювачам — люмінесцентним комплексам металів і кон'югованим полімерам. Зелений флуоресцентний протеїн (англ. аббревіатура GFP) зумовив революційні зміни в побудові клітинних зображень методами флуоресцентної мікроскопії. Роботи з вивчення і застосування цього протеїну було відзначено Нобелівською премією 2008 року. Аналіз фізичних основ та клінічних перетворень, що спричинюють спонтанне утворення флуорофорів GFP, також подано в цьому розділі.

Огляд робіт зі створення молекулярних і наноструктур, здатних до молекулярного пізнавання (специфічного зв'язування з аналітом), наведено в розділі 5. Їх широкий спектр — від синтетичних зв'язувальних молекул до моноклональних антитіл і їхніх фрагментів зумовлений широким набором аналітів, що їх необхідно визначати. На особливу увагу тут заслуговують аптамери — полінуклеотиди з пізнавальними властивостями, що можуть бути відібрані з великих масивів цих сполук (бібліотек).

Якщо вже підібрано відповідний рецептор, який здатен взаємодіяти з аналітом з потрібною афінністю, то як перетворити сигнал про цю взаємодію у флуоресцентну відповідь? Розділ 6 містить відповідь на ці питання.

Флуоресцентні барвники і наноструктури можуть перетворювати такий сигнал, використовуючи механізми фотоперенесення електронного заряду і протона (внутрішньомолекулярний процес) та резонансного фотоперенесення енергії (FRET) — процесу, що потребує як мінімум двох партнерів — донора й акцептора. FRET сприяє значному підсиленню сигналу завдяки залученню великої кількості молекул або наночастинок — донорів флуоресценції, що в збудженому стані передають енергію одній молекулі — акцептору. Тут можуть бути задіяні конформаційні зміни в рецепторі, а також явища агрегації — дезагрегації.

Функціонально важливі наноструктури можуть бути створені за двома принципами: «згори донизу» — подрібненням структур більшого розміру та «знизу догори» — самозбиранням.

У розділі 7 проаналізовано різні методи створення таких структур і показано, що найефективнішим є метод «знизу догори». Цей метод може бути застосований до різних будівельних блоків — від молекулярних до наноструктурних і поєднувати у створеному наноконкомпозиті різні функції. Такі наноконпози-

ти можуть включати елементи, запозичені з живої природи, зокрема фосфоліпідні бішари.

В розділі 8 висвітлено можливості заміни оптичного збудження іншими видами збудження та одержання значного підсилення відповіді за допомогою додаткових процесів та їх механізмів, що набуло застосування і в сенсорах. Це — хемілюмінесценція, катодна електрохемілюмінесценція та біоломінесценція. Можуть бути застосовані нелінійні оптичні ефекти — двофотонне збудження, резонансне підсилення (лазерна дія), підсилення флуоресцентної відповіді за допомогою резонансної взаємодії з наночастинками срібла (плазмоніка).

Розділ 9 повністю присвячено техніці одержання, вимірювання й аналізу флуоресцентного сигналу в різних умовах, пристосованих до флуоресцентної сенсорики. Розглядаються різні флуоресцентні пристрої з наголосом на можливості їх мініатюризації та одночасного виміру великої кількості зразків. Показано схеми мікропроточних приладів, що являють собою мікроскопічні лабораторії з можливостями фракціонування, хімічних і біохімічних реакцій та одержання флуоресцентної відповіді.

Розділ 10 сконцентровано на розгляді методів дослідження і визначення концентрацій різних аналітів. Для цього використовуються різні молекули, наносенсори і наноконpozити, що поєднують рецепторні властивості зі здатністю до флуоресцентної відповіді. Такі системи спроможні детектувати малі молекули та іони, а також макромолекули протеїнів, нуклеїнових кислот і полісахаридів. Окремо виділено проблему детектування шкідливих мікроорганізмів. Обговорюються найбільш ефективні рішення цих проблем. Наголошується, що не існує єдиного методу чи підходу, який був би оптимальним для визначення різних аналітів. Дослідник або розробник має визначатись у виборі методу детекції, враховуючи усі можливості щодо вибору рецептора і способу генерації флуоресцентної відповіді.

Побудова зображень клітин і тканин за допомогою сучасних методів мікроскопії висвітлюється в розділі 11. Демонструються нові широкі можливості для досліджень із застосуванням новітніх методів конфокальної, двофотонної мікроскопії, а також мікроскопії повного внутрішнього відбиття світла. Особливу увагу приділено методам, що дозволяють реєструвати флуоресценцію окремих молекул. Наночастинки і, зокрема, квантові точки набули широкого застосування у вивченні клітин. Ці результати було узагальнено і проаналізовано. Значним досягненням автора і наукового колективу, що з ним співпрацював, було розроблення нового методу детектування

апоптозу (запрограмованої загибелі клітин). Метод базується на флуоресцентній відповіді барвника, інтегрованого в її плазматичну мембрану.

В останньому (12-му) розділі книги автор намагається заглянути у майбутнє флуоресцентних сенсорних технологій, намітити напрями для подальших досліджень і розробок. Ставиться задача одночасного вивчення усіх генів (генома), усіх синтезованих протеїнів (протеома) та усіх їхніх взаємодій (інтерактома). Її розв'язання неможливе без подальшого розвитку флуоресцентних методів детекції. Пропонуються шляхи такого розвитку.

Важливим залишається і пошук нових засобів клінічної діагностики, серед яких перевага надаватиметься неінвазивним методам, що сполучатимуть високу інформативність (у сенсі великої кількості діагностично важливих аналізованих речовин) з простотою процедури і швидкістю одержання результату.

Багатофакторний аналіз дозволить значною мірою відтворити людські відчуття запаху й смаку (електронний ніс та електронний язик), а також завдяки доступному для кожної людини аналізу внутрішнього стану організму і стану довкілля зробити життя людини більш визначеним, тривалим і щасливим.

Незважаючи на те, що в монографії розглядається значний обсяг досить складного матеріалу, текст викладено ясно, послідовно, доступно для сприйняття, зі включенням багатьох схем і рисунків, що полегшує розуміння матеріалу. Безумовно, вона матиме попит не тільки у науковців — фахівців із флуоресцентної сенсорики, але й буде популярним підручником для студентів відповідних спеціальностей. Видання книги відомим і одним із найпрестижніших наукових видавництв у світі Springer-Verlag є беззаперечним визнанням фахового авторитету автора, свідченням значного потенціалу вчених України та сприяє інтеграційному процесу вітчизняних наукових шкіл до світового наукового простору.

Книга О. П. Демченка вже одержала схвальні відгуки наукової громадськості. Зокрема, позитивні рецензії на неї надруковано в авторитетних наукових журналах: *Journal of the American Chemical Society* та *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

*Кандидат біологічних наук
В. І. Назаренко*