ფლუორესცენცია და ფლუორესცენტური მეთოდები. ქემილუმინესცენცია

ირმა თიკანაძე

irmatikanadze@gmail.com

ქიმიის დეპარტამენტი, ზუსტ და

საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი,

II სემესტრის დოქტორანტი

ივ.ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელწიფო

უნივერსიტეტი თბილისი, ი.ჭავჭავაძის გამზ. 1

სასემინარო ნაშრომი
დოქტორანტის მეორე სემინარი

ხელმძღვანელი: ქიმიის მეცნიერებათა დოქტორი,

ასოცირებული პროფესორი მარინა რუხაძე

ანოტაცია

ნაშრომში განხილულია მოვლენები, რომლებიც დღეისათვის მეცნიერების ინტენსიური კვლევის საგანს წარმოადგენს: ლუმინესცენცია და მისი სახეები, ფლუორესცენცია, ქემილუმინესცენცია, ბიოლუმინესცენცია და სხვა. ასევე ქიმიური ანალიზის აქტუალური და საინტერესო მეთოდები - ფლუორესცენტური მეთოდები, რომელიც ეფუძნება ფლუორესცენციის მოვლენას.

ანალიზის ფლუორესცენტური მეთოდები გამოირჩევა უნიკალური მგრძნობიარობით და სიიაფით. ბოლო დროს განსაკუთრებით იზრდება ფლუორიმეტრიის გამოყენების სფეროები, არეალი და პერსპექტივები. ფლუორესცენტული ანალიზის მეთოდებს აქვთ მთავარი დამოუკიდებელი მნიშვნელობა მრეწველობისათვის ფარმაცევტული პრეპარატების წარმოებაში, რამდენადაც ფუნქციონალური ანალიზის ჩატარება აუცილებელი და გარდაუვალი სტადიაა რთული ნარევების თვისებითი შედგენილობის განსაზღვრისათვის. ამიტომ ფარმაცევტული ანალიზის განვითრებისათვის სამკურნალო საშუალებების ხარისხის კონტროლისა და სტანდარტიზაციის საკითხებში ამ მეთოდების გამოყენება ძალიან აქტუალურია. ასევე მნიშვნელოვანია ფლუორესცენტური მეთოდების როლი ბიოლოგიასა და ბიომედიცინაში უჯრედშიდა ნივთიერებების შესწავლისა და მრავალი დავადების დიაგნოსტირებისათვის.

თემა - ფლუორესცენცია, ანალიზის ფლუორესცენტური მეთოდები, ქემილუმინესცენცია

ამოცანები:

- ცნებების: ლუმინესცენცია, ფლუორესცენცია, ფლუორიმეტრია, ქემილუმინესცენცია განმარტება
- ფლუორესცენციის პრინციპების თეორიული მიმოხილვა
- ანალიზის ფლუორესცენტური მეთოდების განხილვა
- ფლუორესცენტური მეთოდების გამოყენების მაგალითების განხილვა
- დასკვნა

შინაარსი

1. შესავალი: გამოსხივების სხვადასხვა სახეები და მათი წარმოშობის მიზეზები, ლუმინესცენცია

2. ფლუორესცენცია

3. ანალიზის ფლუორესცენტური მეთოდები

4. ქემილუმინესცენცია და ბიოლუმინესცენცია

5. გამოყენება

დასკვნა

გამოყენებული ლიტერატურა

1.შესავალი

გამოსხივების სხვადასხვა სახეები და მათი წარმოშობის მიზეზები, ლუმინესცენცია

მოლეკულებისა და ატომების მიერ გარემოდან მიწოდებული ენერგიის შთანთქმის უნარი იწვევს ნივთიერების ახალ ენერგეტიკულ მდგომარეობას, რომელსაც აღგზნებული მდგომარეობა ეწოდება. აღგზნებისას მიღებული ჭარბი ენერგია შეიძლება დაიხარჯოს ელექტრონის მოწყვეტაზე - იონიზაციაზე, ფოტოქიუმიურ რეაქციებზე, ნივთიერების გახურებაზე (ანუ ჭარბი ენერგია სითბურ ენერგიად გადაიქცევა). გარდა ამისა, აღგზნებული მოლეკულები ან ატომები ჭარბ ენერგიას ან მის ნაწილს ასხივებენ სინათლის სახით. გამოსხივების სახეებია: სითბური, საკუთარი, რადიაციული, ლუმინესცენციური გამოსხივებები.

1.სითბური გამოსხივება. როგორც წესი, მყარ ნივთიერებათა უმრავლესობა ძლიერი გახურებისას ნათებას იწყებს. გავარვარებულ სხეულთა ასეთ ნათებას **ტემპერატურულ ანუ სითბურ გამოსხივებას** უწოდებენ. რაც მეტ ენერგიას შთანთქავს სხეული მოცემულ ტემპერატურაზე, მით მეტად ასხივებს იგი. სითბური გამოსხივების მიზეზია ნაწილაკთა მოძრაობის კინეტიკური ენერგია. ტემპერატურული გამოსხივების სპექტრი დამოკიდებულია მხოლოდ სხეულის ტემპერატურაზე და არა თვით ნივთიერებაზე (200-1000ნმ).

2. **საკუთარი გამოსხივება სითბური მოძრაობის ხარჯზე.**

3. რადიაციული გამოსხივება. მაღალი ენერგის გამა კვანტების გამოსხივება ბირთვული რეაქციების შედეგად, რომლის სპექტრი -ხისტი გამა გამოსხივებაა და მისის ტალღის სიგრძე დამოკიდებულია იმაზე, თუ რომელი ბირთვები იშლება (<0,1 ნმ).

4. ლუმინესცენცია.ზოგიერთ ნივთიერებას ახასიათებს ნათების უნარი ოთახის ტემპერატურაზეც, გახურების გარეშე, რაც **ცივი ნათების ანუ ლუმინესცენციის** სახელითაა ცნობილი. სითბური გამოსხივებისგან განსხვავებით ლუმინესცენტური გამოსხივება არაწონასწორულია და გრძელდება შედარებით დიდხანს გარე აღმგზნები ფაქტორის ზემოქმედების შეწყვეტის შემდეგაც. ამგვარად, ლუმინესცენცია არის ნვთიერების ნათება მის მიერ აღმგზნები ენერგიის შთანთქმის შედეგად.:

$$M^{*} \leftrightarrow M + h\nu.$$

შედარებით დაბალ ენერგეტიკულ მდგომარეობაში გადასვლისას, აღგზნებული ნაწილაკები ასხივებენ სინათლის კვანტს - ლუმინესცირებენ. შემდგომი ნათების ხანგრძლივობა სხვადასხვა ლუმინესცენტური ნივთიერებისთვის სხვადასხვაა: წამის მემილიარდე ნაწილიდან (ცალკეული ატომებისა და მოლეკულებისათვის) რამდენიმე საათამდე და რამდენიმე დღე-ღამემდეც კი (კრისტალოფოსფორებისთვის).

ლუმინესცენციის მოვლენა მრავალგვარია თვისებებითა და წარმომავლობით. ლუმინესცენციის სხვადასხვა სახე განისაზღვრება აღმგზნები ენერგიის ხასიათით, ნათების ხანგრძლივობით და ლუმინესცენტური ნივთიერებების ქიმიური თვისებებით.

ლუმინესცენციის სახეობის მიხედვით განიხილავენ ლუმინესცენტური ანალიზის შემდეგ სახეებს:

1. ფოტოლუმინესცენცია, ანუ ფლუორესცენცია, აუტოფლუორესცენცია და ფოსფორესცენცია, დაფუძნებული სინათლის ენერგიის შთანთქმის შედეგად ნივთიერების ნათებაზე. 2. კათოდოლუმინესცენცია, აჩქარებული ელექტრონული ნაკადით ბომბარდირებისას გამოწვეული ნათება; 3. იონოლუმინესცენცია; 4.რენტგენოლუმინესცენცია; 5. რადიოლუმინესცენცია; 6. ელექტროლუმინესცენცია; 7. თერმოლუმინესცენცია; 8. ქემილუმინესცენცია - ნივთიერებების ნათება გამოწვეული ზოგიერთი ქიმიური პროცესით;

9. ტრიბოლუმინესცენცია - ხახუნის ლუმინესცენცია; 10.ბიოლუმინესცენცია; 11. სონოლუმინესცენცია.

ყველა ლუმინესცენირებადი ნივთიერების საერთო სახელწოდებაა **ლუმინოფორები**. არაორგანული ლუმინოფორებისაგან განსხვავებით, ორგანულ ნივთიერებებს ორგანოლუმინოფორებს უწოდებენ. ისინი არსებითად განსხვავდებიან ნათების ბუნების მიხედვით. ორგანოლუმინოფორების შემთხვევაში ლუმინესცირებენ მოლეკულები, ხოლო არაორგანული ლუმინოფორების შემთხვევაში ლუმინესცირებენ არა ცალკეული ნაწილაკები, არამედ კრისტალური სტრუქტურები. მათ **კრისტალოფორებს** უწოდებენ.

ცნობილია ნათების წარმოშობის ორი მექნიზმი: **1.** ცალკეული ცენტრების ნათება, როცა ლუმინესცენციის პროცესის წარმოშობა მიმდინარეობს მხოლოდ ერთ ნაწილაკში (ნათების ცენტრში), რომელიც არის როგორც ენერგიის შთანმთქმელი, ისევე სინათლის კვანტების გამომსხივებელი,და **2.** ნათების რეკომბინაციული პროცესები , რომელთა დროს, როგორც წესი, ენერგიის შთანთქმა ხდება არა იმ ნაწილაკების მიერ, რომლებიც ასხივებენ სინათლის კვანტებს.

პირველი მექანიზმის მიხედვით ხორციელდება ორგანულ ნივთირებათა უმრავლესობის და მათ შორის ორგანოლუმინოფორების კათიონებთან შიდაკომპლექსური ნაერთების ნათება ხსნარებში.

მოლეკულური მესრის მქონე ნივთიერებების, მაგ., ნაფტალინის, ანტრაცენის და მისი ნაწარმების, კრისტალების ნათება განისაზღვრება **რეკომბინაციული** პროცესებით. ასეთი ნათება ახასიათებს თუთიის სულფიდს, კადმიუმის სულფიდს, კალციუმის ოქსიდს და ა.შ.; კრისტალური სტრუქტურები, რომლებსაც მინარევთა ჩანართებით (ან აქტივატორბით) - მძიმე მეტალების იოენბით გამოწვეული რაღაც დეფექტები აქვთ. ამ დროს ლუმინესცენციის წარმოშობაში მონაწილეობს მთელი კრისტალი. ნათების ამ სახეს **კრისტალოფოსფორების ნათებას** უწოდებენ.

2. რა არის ფლუორესცენცია ?

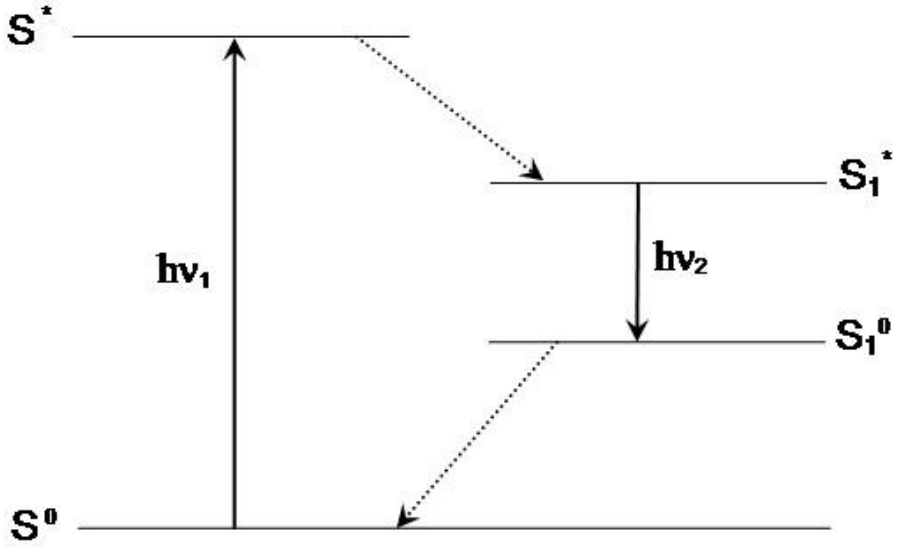
ანალიტიკურ პრაქტიკაში უფრო ფართო გამოყენება აქვს ფოტოლუმინესცენციას, კერძოდ ფლუორესცენციას. ლუმინესცენციის კერძო შემთხვევას. მან სახელი მიიღო მინერალ ფლუორიტისაგან, რომელიც 1529 წელს მინერალოგიის ფუძემდებელმა გრეგორი აგრიკოლამ აღმოაჩინა. ულტრაიისფერი სხივებით დასხივებისას მინერალი, რომელიც შეიცავს ფლუოროფორს, იწყებს ნათებას. სუფიქსი-*escent* —აღნიშნავს სუსტ მოქედებას.

ფლუორესცენცია არის საანალიზო ხსნარის ან კრისტალოფორების დამახასიათებელი ნათება ულტრაიისფერ შუქზე. ესაა ფიზიკური მოვლენა, რომლის არსიც მდგომარეობს სინათლის კვანტის მოკლევადიან შთანთქმაში ფლუოროფორის მიერ სხვა კვანტის მომდევნო სწრაფი ემისიით, რომელსაც განსხვავებული თვისებები აქვს, ვიდრე შთანთქმულს. [2]

პირველად ქინინის ნაერთების ფლუორესცენციას აკვირდებოდა ფიზიკოსი ჯორჯ სტოქსი 1852წ.

ლუმინოფორის მნიშვნელოვან მახასიათებელს წარმოადგენს აღგზნებული მდგომარეობის გამოსხივების დრო, ე.ი. ის დრო, რომლის განმავლობაში გრძელდება სინათლის გამოსხივება აღმგზნები წყაროს მოცილების შემდეგ. ამ მნიშვნელობების მიხედვით ანსხვავებენ ფლუორესცენციას (გამოსხივების დრო - 10^{-9}-10^{-7} წმ) და ფოსფორესცენციას (გამოსხივების დრო 10^{-4}-10^{-2} წმ).

ფლუორესცენციის მოვლენა შეიძლება გამოვსახოთ **იაბლონსკის დიაგრამის** (ნახ.1) მიხედვით. ფლუორესცენტული საღებრის მიერ გარკვეული ენერგიის ფოტონის შთანთქმა (h**ν** აღგზ) იწვევს მის გადაყვანას ძირითადი მდგომარეობიდან S_0 აღგზნებულ სინგლეტურ მდგომარეობაში S_1^*. მოლეკულა აღგზნებულ მდგომარეობაში რჩება მხოლოდ 1-10 ნწმ-ის განმავლობაში. ამ პერიოდში ადგილი აქვს კონფორმაციულ ცვლილებებსა და ურთიერთქმედებებს მოლეკულურ გარემოსთან: შეჯახებით ჩახშობას, ფლუორესცენტული ენერგიის გადატანას და სხვა. ამის შედეგად ენერგია S^*_1, ნაწილობრივ იხარჯება და წარმოიქმნება რელაქსაციური სინგლეტური აღგზნებული მდგომარეობა S_1, რომელიც საწყის მდგომარეობაში S_0 დაბრუნებისას გამოათავისუფლებს ენერგიას $\mathbf{h\nu_{\text{გამ}}}$ ფლუორესცენტული გამოსხივებით.



ნახაზი.1 იაბლონსკის დიაგრამა

ფლუორესცენტული ნაერთებია მრავალი ორგანული ნივთიერება შეუღლებული π-ბმებით. ყველაზე ცნობილია ქინინი, მეთილის მწვანე, ფლუორესცინი, ზოზინი, რორორი, როდამინები და სხვა.

3. ანალიზის ლუმინესცენტური და ფლუორესცენტური მეთოდები

თვისებით ლუმინესცენტურ ანალიზში ნათების ფერის და, განსაკუთრებით, ლუმინესცენციის სპექტრის მიხედვით შეიძლება დავადგინოთ ამა თუ იმ ნივთიერების არსებობა სინჯში. სინჯისა და მასში შესაძლო შემავალი ინდივიდუალური ნივთიერების ლუმინესცენციის სპექტრების შედარებისას, ძირითად ყურადღებას აქცევენ ზოლების სიგანესა და მაქსიმუმების მდებარეობას, ასევე მათი ფაქიზი სტრუქტურის არსებობასა და ხასიათს. ლუმინესცენციის სპექტრის მიხედვით ამა თუ იმ ნივთიერების არსებობის დადგენა სინჯში არც თუ ისე იოლი ამოცანაა. სირთულე განპირობებულია იმით, რომ მრავალი ნივთიერების ნათება ადამიანის თვალისთვის ერთნაირად აღიქმება, ხოლო მათი ლუმინესცენციის სპექტრები შედგება ფართე და გადღაბნილი ზოლებისაგან.

ამ დროს არ შეიძლება ველოდოთ ნივთიერებათა წარმატებულ იდენტიფიკაციას. ნივთიერებათა მხოლოდ მცირე რაოდენობას ახასიათებს ლუმინესცენციის მკვეთრი და დამახასიათებელი სპექტრები, რომლებიც საშუალებას იძლევიან დამაჯერებლად ვისაუბროთ მათ არსბობაზე სინჯში. მათ მიეკუთვნება ურანის (VI) ნაერთები, ლანთანოიდები, ბენზოპირენები, პორფირინები და სხვა.

სინჯში რამდენიმე ლუმინოფორის არსებობისას მიმართავნ მათი დაყოფის პროცედურას - ექსტრაქციას, ქრომატოგრაფიას. ზოგჯერ კი შესაძლებელი ხდება სინჯის ანალიზი წინასწარი დაყოფის გარეშეც, ცალკეული კომპონენტების სპექტრების შერჩევითი აღგზნებით.

ლუმინესცენციის სპექტრების შესწავლის საფუძველზე შესაძლებელია გამოვიტანოთ დასკვნები საკვლევი ნივთიერების ქიმიური სტრუქტურის შესახებ. ასევე დავაკვირდეთ გარკვეულ დროში ნივთიერების ცვლილებას. იმ ნივთიერებების აღმოსაჩენად, რომლებიც თავად არ ლუმინესცირებენ, იყენებენ რეაქციებს, რომელთა შედეგად ლუმინოფორები წამოიქმნება-ე.წ. ლუმინესცენტური რეაქციები. ზოგჯერ საკვლევი ნივთიერების არსებობა სინჯში შესაძლებელია დავადგინოთ დამხმარე ლუმინოფორის (რომელიც სინჯშია შეყვანილი) ლუმინესცენციის ნაწილობრივი ან სრული ჩაქრობით.

რაოდენობრივი ლუმინესცენტური ანალიზი დამყარებულია ლუმინესცენციის ინტენსივობასა $I_{f\ (ფარდ,\ სიდ)}$ და სინჯში ლუმინოფორის შემცველობას (**c**)შორის დამოკიდებულებით

$$I_f = k \cdot c, \qquad (1.1)$$

სადაც I_f – ლუმინესცენციის ინტენსივობაა; ***c*** – მოლური კონცენტრაცია, მოლი/ლ;***k*** – კოეფიციენტი, დამოკიდებული ნივთიერების ბუნებაზე.

ეს დამოკიდებულება სამართლიანია მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ სინჯში საკვლევი კომპონენტის შემცველობა არ აჭარბებს გარკვეულ ზღვრულ მნიშვნელობას:

10^{-4}…10^{-3} M (თხევადი სინჯებისთვის);

10^{-4}…10^{-3} % (მყარი სინჯებისთვის).

ყველაზე ხშირად ლუმინესცენციის აღძვრისათვის გამოიყენება ულტრაიისფერი (უი) გამოსხივების წყარო. თუ ლუმინოფორი ფლობს სპექტრის ხილულ ზონაში ინტენსიურ შთანთქმას, მაშინ მისი ლუმინესცენირებისათვის შეიძლება გამოყენებულ იქნას გამახურებელი ნათურა ან ლაზერული გამოსხივება (ბოლო დროს უფრო ხშირად გამოიყენება).

ლუმინესცენტური ანალიზის მეთოდი, ისევე როგორც ფოტომეტრიული მეთოდი, მიეკუთვნება ანალიზის ოპტიკურ მეთოდებს, ამიტომ მათ ბევრი საერთო აქვთ. მაგრამ, ფოტომეტრიასთან შედარებით, ლუმინესცენტური მეთოდი გაცილებით უფრო მგრძნობიარეა. რაც დაკავშირებულია აღგზნებული მოლეკულის მიერ გამოსხივებული სინათლის ნაკადის აბსოლუტური სიდიდის განსაზღვრასთან, ამიტომ მარგი სიგნალის ხმაურთან შეფარდება საკმაოდ დიდია. ლუმინესცენტურ მეთოდში ფოტომეტრიისგან განსხვავებით, ფოტონაკადის სიდიდე, რომელიც ლუმინესცენციის სინათლის პროპორციულია, შესაძლებელია მრავალჯერ გაძლიერდეს ელექტრონული გამაძლიერებლებით. ეს უკანასკნელი საშუალებას იძლევა განისაზღვროს ნივთიერების რაოდენობა ერთი-ორი რიგით უფრო მცირე სიდიდით, ვიდრე ფოტომეტრული მეთოდით.

მეორე უპირატესობა არის შედარებით მაღალი შერჩევითობა, რამდენადაც ნივთიერებათა მხოლოდ მცირე რიცხვს აქვს ლუმინესცენირების უნარი.

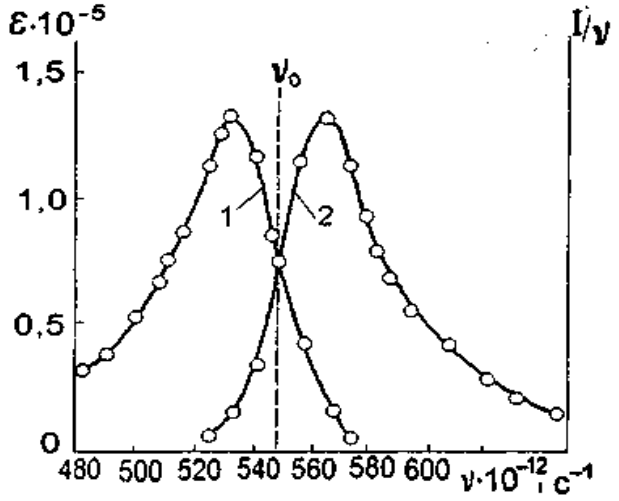
ფლუორომეტრია - ფლუორესცენტური ანალიზის მეთოდია, რომელიც ემყარება მონოქრომატული დასხივებისას აღძრული ფლუორესცენციის ინტენსივობის მიხედვით ნითიერების კონცენტრაციის განსაზღვრას. ხსნარში ლუმინოფორის შემცველობის განსაზღვრის მეთოდი დამყარებულია ფლუორესცენციის სპექტრის ცვლილებაზე. მონოქრომატული გამოსხივების წყაროდ გამოიყენება სხვადასხვა ლაზერები და ვერცხლისწყლის ლამპები. საჭირო სპექტრის გამიყოფისთვის იყენებენ ინტერფერენციულ ფილტრებს და მონოქრომატორებს. ამ მეთოდს საფუძვლად უდევს შემდეგი კანონზომიერებანი:

ლუმინესცენციის სპექტრი არ არის დამოკიდბული აღმგზნები სინათლის ტალღის სიგრძეზე. ეს აიხსნება იმით, რომ აღგზნებული მოლეკულები, რომლებმაც შთანთქეს სხვადასხვა სიდიდის კვანტები, ხვდებიან სხვადასხვა აღგზნებულ ელექტრონულ-რხევითი მდგომარეობის მქონე დონეებზე. ჭარბი ენერგიის ასეთი გადანაწილების შემდეგ ხდება გამოსხივებითი გადასვლა ერთი და იმავე ელექტრონული შრეებიდან, ამიტომ ლუმინესცენციის სპექტრი არ იცვლება.

სტოქს-ლომელის კანონი. სტოქსმა ჩამოაყალიბა წესი, რომლის თანახმადაც ნივთიერების ფლუორესცენციის სპექტრს ყოველთვის ტალღის უფრო დიდი სიგრძე აქვს, ვიდრე შთანთქმისა. ლომელმა დააზუსტა სტოქსის წესი, შემოიტანა რა შემდეგი ფორმულირება: **,,გამოსხივების სპექტრი მთლიანად და მისი მაქსიმუმი ყოველთვის წანაცვლებულია შთანთქმის სპექტრთან და**

მის მაქსიმუმთან შედარებით გრძელი ტალღების მხარეს“. ეს კანონი მკაცრად სრულდება ფლუორესცირებადი ნივთიერებების დიდი რაოდენობისთვის.

გამოსხივებისა და შთანთქმის სპექტრების სარკისებური სიმეტრიის წესი. ეს წესი აღწერს ლუმინესცენტური ნივთიერებების გამოსხივებისა და შთანთქმის სპექტრების ურთიერთგანლაგებას და შეიძლება მიეცეს შემდეგი ფორმულირება: **,,შთანთქმისა და გამოსხივების ნორმირებული(ერთ მაქსიმუმამდე მიყვანილი) სპექტრები, გამოსახული სიხშირეთა ფუნქციით, სარკისებურად სიმეტრიულები არიან იმ მართობის მიმართ,რომელიც გადის სიხშირეთა ღერძის პერპენდიკულარულად ორივე სპექტრის გადაკვეთის წერტილზე“. (ნახ.2)**



ნახაზი 2 . შთანთქმის ε = *f* (*ν*) (1 მრუდი)

და ფლუორესცენციის *I*/*ν* = *f*(*ν*) (მრუდი 2) სპექტრების სარკისებური სიმეტრია როდამინ 6G აცეტონში

ეს წესი ძალიან გამოსადეგია ლუმინესცენტური ანალიზის დროს. ასევე სპექტრების გაშიფვრისა და საკვლევი მოლეკულების ენერგეტიკული დონეების დადგენისას. ნივთიერებებისთვის, რომლებიც ემორჩილებიან სარკისებური სიმეტრიის წესს, ერთ-ერთი სპექტრის (შთანთქმის ან ლუმინესცენციის) მიხედვით შეიძლება განვსაზღვროთ მეორე სპექტრის ფორმა და შევარჩიოთ მოცემული სახის ანალიზისთვის შესაფერისი შუქფილტრები.

ნივთიერება-ლუმინოფორებს განსაზღვრავენ მათი საკუთარი ფლუორესცენციით. თუ საკვლევი ნივთიერება არ არის ლუმინოფორი, მაშინ მისი განსაზღვრისთვის იყენებენ ლუმინესცენტურ რეაქციებს. ეს უკანასკნელნი უნდა იწვევდნენ ხსნარის ფლუორესცენციის აღძვრას ან შესუსტებას. როგორც ანალიზის დროს გამოყენებული ყველა რეაქცია, ლუმინესცენტური რეაქციაც უნდა წარიმართოს სწრაფად, იყოს განმეორებადი და შეძლებისდაგვარად შერჩევითი. მეტალთა იონების ფლუორომეტრული განსაზღვრისას უფრო ხშირად იყენებენ ორგანულ რეაგენტებთან კომპლექსწარმოქმნის რეაქციებს. იდეალურ შემთხვევაში რეაგენტები არ უნდა ფლუორესცირებდნენ, ხოლო წაროქმნილი კომპლექსები, პირიქით, უნდა ხასიათდებოდნენ

ინტენსიური ფლუორესცენციით. ასეთი რეაგენტების მოლეკულები ჩვეულებრივ არაბრტყელი და არახისტი არომატული სტრუქტურით ხასიათდებიან და შეიცავენ ელექტრონდონორულ ჩამნაცვლებლებს. კომპლექსწარმოქმნის რეაქციის შედეგად ეს მოლეკულები იღებენ ბრტყელ ხისტ კონფიგიურაციას, რომელსაც ფლუორესცენციის უნარი აქვს.

ანიონების განსაზღვრისათვის ხშირად მიმართავენ არაპირდაპირ ფლუორომეტრულ მეთოდს, დაფუძნებულს ლუმინესცენციის ჩაქრობაზე. ასეთი მეთოდის მაგლითად გამოდგება იოდიდ-იონების განსაზღვრა ფლუორესცინის ფლუორესცენციის ჩაქრობის მიხედვით.

ლუმინესცენციის ჩაქრობა დამოკიდებულია როგორც ლუმინესცირებული სხეულის ბუნებაზე და მის აგრეგატულ მდგომარეობაზე, ისევე შინაგან პირობებზე. ამის მიზეზი შეიძლება იყოს კრისტალებში რაიმე მინარევის მოხვედრა, ან ხელოვნურად შეყვანა, ანდა რადიაციული დეფექტების ხარჯზე.

რაოდენობითი ლუმინესცენტური ანალიზის **სირთულე** მდგომარეობს იმაში, რომ ლუმინესცენციის ინტენსივობა დამოკიდებულია არა მარტო სინჯში საკვლევი ნივთიერების არსებობაზე, არამედ რამდენიმე სხვა ფაქტორზეც: ლუმინესცენციის ჩაქრობაზე, გარემოს **pH** -ზე, კომპლექსონების მასურ წილზე და სხვ. ამის გამო, საჭიროა, როგორც სინჯის მომზადებასთან დაკავშირებული, ასევე აღგზნების პირობებისა და ლუმინესცენციის სპექტრის რეგიტრაციასთან დაკავშირებული ყველა რეკომენდაციის ზედმიწევნით დაცვა.

ფლუორესცენციის მოვლენის შესწავლა და , ასევე, ლუმინესცენტური ანალიზის ჩატარება ხდება სპეციალური ხელსაწყოების მეშვეობით: ფოსფოროსკოპებით, ფოტომეტრებით, ფლუორიმეტრებით, ლუმინოსკოპებით - უმარტივესი ხელსაწყოებით, რომლებიც მოიცავენ აღმგზნები გაოსხივების წყაროს და შუქფილტრების ნაკრებს. ლუმინესცენციის ინტენსივობის შეფასება ხდება ვიზუალურად, როგორც წესი, სტანდარტული სერიების მეთოდით. ფოტო და ფლუორომეტრებს აქვთ პრაქტიკულად იგივე ძირითადი კონსტრუქციული კვანძები, რაც ყველა სპექტრალურ ხელსაწყოს: შუქის წყარო, მონოქრომატიზატორი, ლიუვეტები საკვლევი ნივთიერებებით, გამოსხივების ინტენსივობის განსაზღვრის კვანძი.

4. ქემილუმინესცენცია და ბიოლუმინესცენცია

ქემილუმინესცენცია არის სხეულთა ლუმინესცენცია, გამოუწვეული ქიმიური ზემოქმედებით. (მაგალითად, ფოსფორის ნათება ნელი ჟანგვისას), ან ქიმიური რეაქციის მიმდინარეობისას (მაგალითად, მჟაუნმჟვას ზოგიერთი ეთერის კატალიზური რეაქცია წყალბადის ზეჟანგთან ლუმინოფორის თანაობისას). ქემილუმინესცენცია დაკავშირებულია ეგზოთერმულ ქიმიურ პროცესებთან.

ქემილუმინესცენცია ფართოდ გამოიყენება სინათლის ავტონომიურ ქიმიურ წყაროებში. ასევე მარკერად ტივტივებისათვის, მანათობელ სამაჯურებშა და ჯოხებში, ქიმიურ ლაზერებში.

სინათლის ერთჯერადი წყაროები ეფუძნება დიაილ-(ჰეტერილ)-ოქსალატების დაჟანგვას წყალბადის ზეჟანგით აქტივატორისა და ძირითადი კატალიზატორის თანაობისას უწყლო აპროტონულ გამხსნელში, მაგალითად, დიმეთილ-ან დიბუტილფტალატში. ლუმინოფორებად გამოიყენება პოლიციკლური არენები (პერილენი -ცისფერი ნათება, რუბრენი-ნარინჯისფერი). რამდენიმე ლუმინოფორის კომბინაციით ღებულობენ თეთრ ნათებას. შიგა ამპულის გატეხვისას, კომპონენტები ერთმანეთს ერევა და იწყება ნათება, რომელიც გრძელდება დანიშნულების მიხედვით 60 წმ-დან 3-4 დღემდე. ასეთი შუქის უპირატესობა არის კომპაქტურობა, ცეცხლ- და ფეთქებად- უსაფრთხოება.

ქემილუმინესცენციური ანალიზით ხდება აირთა რთული ნარევების შედგენილობის დადგენა, კერძოდ, ატმოსფეროში მინარვების განსაზღვრა. ამ მეთოდის ღირსებაა მაღალი სელექტიურობა და გაზომვათა ავტომატიზება. ნაკლი კი - საანალიზო ნითიერებების ზღვრული რაოდენობა.

ქემილუმინესცენცია, რომელიც მიმდინარეობს ცოცხალ ორგანიზმებში (მწერების, მატლების, თევზების ნათება) ანუ **ბიოლუმინესცენცია** დაკავშირებულია ჟანგვით პროცესებთან. ბიოლუმინესცენცია არის ცოცხალი ორგანიზმების დამოუკიდებლად ან სიმბიონტების საშუალებით ნათების უნარი და ემყარება ორგანიზმში მიმდინარე ქიმიურ პროცესებს, რომელთა დროს თავისუფლდებაენერგია სინათლის სახით. ანუ ის ქემილუმინესცენციის კერძო სახედ გვევლინება.

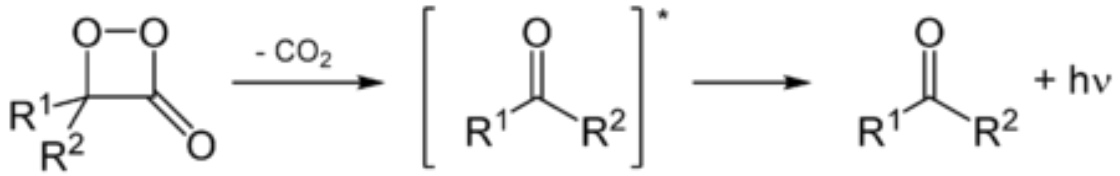
ცოცხალი ორგანიზმების ნათება აღინიშნება ჯერ კიდევ ანტიკური ხანის ავტორებთან - პლინიუს უფროსთან ნაშრომში ,,ბუნებრივი ისტორია“ ნახსენებიაზღვის ორგანიზმების ნათება. ასევე აღწერდნენ ზღვის ნათებას. მაგრამ ბიოლუმინესცენციის შესწავლის ისტორია დასაბამს იღებს 1668 წლიდან, როცა რობერტ ბოილმა წვის პროცესების შესწავლისას ყურადღება მიაქცია მსგავსებას ნახშირის წვისა და ლპობის შედეგად ნათებას შორის.ბოილმა გამოიყენა რა ვაკუუმ-ტუმბო, აჩვენა,რომ ორივე შემთხვევაში ნათება ქრება, თუ მოვაცილებთ ჰაერს(ანუ ჟანგბადს).

ბიოლუმინესცენციის მექნიზმის შესწავლის პიონერი კი გახლდათ რაფაელ დიუბუა, რომელმაც 1887 წელს ჩაატარა ექსპერიმენტი ციცინათელების *Pyrophorus* ექსტრაქტებზე და აღმოაჩინა, რომ მათი ქსოვილების ექსტრაქტები, რომლებიც დამზადებულია ცივ წყალზე, ანათებენ რამდენიმე წუთის განმავლობაში, ხოლო ცხელ წყალზე დამზადებული არ ანათებს. ამასთან, თუ ჩამქრალ ცივ ექსტრაქტს დავამატებთ ცხელ არამანათობელ ექსტრაქტს, ნათება განახლდება. ნათება *in vitro* ჩნდებოდა მხოლოდ ორივე ფრაქციის თანაარსებობისას და ჟანგბადის თანაობისას.ასეთივე შედეგი მიიღო ორსაგდულიანი მოლუსკების *Pholas dactylus* ექსტრაქტებზე ექსპერიმენტის დროსაც. სუბსტრატულ ფრაქციას დიუბუამ უწოდა **ლუციფერინი**, ხოლო ცილოვანს- **ლუციფერაზა** და პოსტულირება გაუკეთა ბიოლუმინესცენციის გამომწვევი რეაქციის ფერმენტატიულ ბუნებას.

ედმონდ ნიუტონ ჰარვეიმ პრინსტონის უნივერსიტეტში შეისწავლა კიბოსმაგვართა ბიოლუმინესცენცია 1920წელს. ხოლო 1957 წელს გამოყვეს და აღწერეს ციცინათელების ლუციფერინი, რომელიც თიაზოლის ნაწარმი აღმოჩნდა.1950-60-იან წლებში ოსამუ სიმომურამ ნაგოის უნივერსიტეტში მიიღო ახალი ლუციფერინი სუფთა კრისტალურ მდგომარეობაში, რომელიც განსხვავდებოდა ციცინათელების ლუციფერინისაგან. შემდეგ კი პრინსტონის უნივერსიტეტში საკვლევად აიღო მედუზა *Aequorea Victoria.* რომლის ფოტოფორები მწვანედ ანათებენ. მან გამოყო მედუზებიდან ეკვორინი - ცილა, და დაადგინა, რომ ეკვორინის ბიოლუმინესცენცია ინიცირდება კალციუმის იონებით და ამ დროს ჟანგბადი არ არის საჭირო. ეს იყო ახალი ტიპის ბიოლუმინესცენტური სისტემა --ფოტოპროტეინების, რომლებშიც სინათლის გამომცემი ფრაგმენტი სუბსტრატი არ არის ლუციფერინი. მან ასევე აღმოაჩინა, რომ გამოყოფილი ეკვორინი *in vitro* ასხივებს ლურჯ სინათლეს, ცოცხალი მედუზა კი - მწვანეს. შემდგომში მწვანე ნათების გამომწვევი აღმოჩნდა ცილა - GFP (*green fluorescent protein*-მწვანე ფლუორესცენტული ცილა). შემდგომში ეს ნივთიერებები ფართოდ გამოიყენება მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიულ პრაქტიკაში. ეკვორინი, როგორც კალციუმის იონების აღმომჩენი, GFP კი როგორც ფლუორესცენტული მარკერი უჯრედული ცილების ექსპრესიის შესწავლისათვის.

ლუციფერინ-ლუციფერაზური სისტემების ტიპები

როგორც უკვე აღინიშნა, ბიოლუმინესცენციის აუცილებელ პირობად გვევლინება ლუციფერინის ჟანგვის რეაქციის მაღალი ენთალპია: ენერგია, რომელიც გამოიყოფა რეაქციის მსვლელობისას უნდა აღემატებოდეს **~41-71.5 კკალ/მოლი.** რაც შეესაბამება ელექტრომაგნიტურ გამოსხივებას ხილულ დიაპაზონში **~400-700ნმ.** ეს ენერგია ალკანებში **C-C** ბმის (**~79კკალ/მოლი)** ენერგიის თითქმის ტოლია. რაც გაცილებით მეტია, ვიდრე ბიოქიმიური რეაქციების უმრავლესობის ენერგეტიკული ეფექტი, მათ შორის ცოცხალ ორგანიზმების ენერგიის მატარებლებში. ატფ-ის ამფ-ად ჰიდროლიზი შეადგენს დაახლოებით 10,9 კკალ/მოლი.



ბიოლუმინესცენციის ყველაზე მეტად გავრცელებული მექანიზმი: **CO_2** -ის მოხლეჩა **დიოქსეთანონიდან** - **ლუციფერინის ჟანგვის** შუალედური პროდუქტიდან, რის შედეგადაც წარმოიქმნება **ოქსილუციფერინი** აღგზნებულ მდგომარეობაში, შემდეგ კი გადადის ძირითად მდგომარეობაში სინათლის გამოსხივებით.

ხილული სპექტრის შესაბამისი ენერგიის მიღება ცოცხალ სისტემებში შესაძლებელია მხოლოდ ერთსტადიიანი დაჟანგვით მოლეკულური ჟანგბადის (ან მისი აქტირუი ფორმების) თანაობისას , ამიტომ ლუციფერაზების უმრავლესობა მიეკუთვნება **ფერმენტ ოქსიგენაზების** კლასს, რომლებიც

აკატალიზებენ ჟანგბადის ლუციფერინთან მიერთების რეაქციებს და , შესაბამისად, ყველა მანათობელი ორგანიზმი აერობებს მიეკუთვნებიან. ლუციფერინების უმრავლესობა ჟანგვისას წარმოქმნის შეუღლებულ ციკლურ შუალედურ პეროქსიდებს -დიოქსიკეტონებს, რომლებშიც სავალენტო კუთხეები ოთხწევრიან ციკლებში მნიშვნელოვნად განსხვავდებიან ნორმალური სავალენტო კუთხეებისაგან და ასეთი ნაერთები იშლებიან ნახშირორჟანგისა და აღგზნებული კეტონ-ლუციფერინის გამოყოფით. ასეთი მექანიზმია დამახასიათებელი ლუციფერინის ჟანგვისათვის მწერებისა და მრავალი ზღვის ბინადარის ორგანიზმში.

დღეისათვის ცნობილია სხვადასხვა ქიმიური ბუნების ლუციფერინების 5 კლასი.

ბიოლუმინესცენცია ასრულებს შემდეგ ბიოლოგიურ ფუნქციებს:

მსხვერპლის ან პარტნიორის მიზიდვა, კომუნიკაცია, გაფრთხილება ან მუქარა, დაფრთხობა ან ყურადღების გადატანა, შენიღბვა შუქის ბუნებრივი წყაროების ფონზე. მრავალ შემთხვევავში ბიოლუმინესცენციის ფუნქცია ჯერ კიდევ არ არის ბოლომდე შესწავლილი ან საერთოდ შეუსწავლელია.

---

5. გამოყენება. ფლუორესცენციის, ქემილუმინესცენციისა და ბიოუმინესცენციის მოვლენებმა ფართო გამოყენება ჰპოვეს მრავალ სფეროში:

საღებრები რომლებიც ხასიათდებიან ფლუორესცენციის უნარით გამოიყენება, როგორც უხილავი მარკერები ფულის კუპიურების, აქციზური მარკებისა და სხვა მასალებისათვის, საკანცელარიო და განსაკუთრებით ჭავლური პრინტერების ფერადი მელნების წარმოებაში. ორგანულ ლუმინოფორებს ასევე დიდი გამოყენება აქვთ მიკრობიოლოგიასა და ქიმიაში. საღებავების წარმოებასა და ტექსტილის სამღებრო საქმეში; ბიოლოგიასა და მედიცინაში, კრიმინალისტიკაში, ლაზერებში, ჰიდროლოგიასა და ეკოლოგიაში.

განსაკუთრებით ფართო გამოყენება ჰპოვა ბიოლოგიურ და ბიოსამედიცინო გამოკვლევებში.[1] ბიოფიზიკის, მოლეკულური და უჯრედული ბიოლოგიის მრავალი მიმართულება აღმოცენდა და ვითარდება სწორედ ამ ახალი მეთოდების დანრეგვის შედეგად, რომლებიც ფლუორესცენციას ეფუძნება.

რამდენიმე მაგალითი:

ბიოფიზიკოსებისთვის ფლუორესცენცია გახდა სწრაფი და მგრძნობიარე მეთოდი ბიოლოგიური მაკრომოლეკულების - ნუკლეინის მჟავებისა [3] და ცილების [4] სტრუქტურის დადგენაში.

დნმ-ის სეკვენირების მეთოდი სენგერის სამუშაოების მეშვეობით გაცილებით დაიხვეწა 1980-იან წლებში სწორედ ფლუორესცენტური დეტექციის დანერგვის შემდეგ. რის შედეგადაც სეკვენირება გახდა გაცილებით სწრაფი და საიმედო. ამასთან შესაძლებელი გახდა სეკვენირების

ავტომატიზება [5] რის შემდეგაც 90-იანი წლების დასაწყისში საფუძველი ჩაეყარა პროექტს ,,ადამიანის გენომი“.

კონფოკალური ფლუორესცენტური მიკროსკოპიის საშუალებითა და მწვანე ფლუორესცენტური ცილის (GFP) და მისი ანალოგების ბაზაზე ახალი ფლუორესცენტური მარკერების შემუშავებით შესაძლებელი გახდა მიეღოთ სპეციფიური კონტრასტული შეფერვა და გადაეღოთ მაღალი ხარისხის ფოტოები მრავალი უჯრედშიდა ცილის სტრუქტურისა.

ფლუორესცენტური ზონდების (ნივთიერებების, რომლებიც იცვლიან ფლუორესცენციას,როცა მათ უერთდება განსაზღვრული მოლეკულა) შექმნით შესაძლებელი გახდა დეტალურად გამოიკვლიონ ცოცხალი ორგანიზმებისა და უჯრედების ქიმიური შედგენილობა და მისი ცვლილება დროსა და სივრცეში. რამაც საფუძველი დაუდო ფლუორესცენტურ მოლეკულურ იმიჯინგს [6].

შემუშავდა და დაინერგა ზემგრძნობიარე მეთოდები სტეროიდული ჰორმონების, პორფირინების, კატექოლამინების, მეტაბოლიტების სამედიცინო პრეპარატების და სხვა სადიაგნოსტიკო ნვთიერებების სწრაფი ანალიზისათვის შარდში და სისხლის პლაზმაში. იმუნოფერმენტული ანალიზის დახმარებით ფლუოროგენური სუბსტრატების გამოყენებით ატარებენ სხვადასხვა დაავდების ბიომარკერების დეტექციას. აქტირუად მუშავდება *in vivo-, in situ-, in vitro-* ფლუოროცენტული დიაგნოსტიკის მეთოდები. კერძოდ, შეიქმნა ფლუორესცენტული ზონდები, რომლებიც სელექციურად ღებავენ ავთვისებიან წარმონაქმნებს და ეხმარებიან ადრეულ დიაგნოსტიკაში ენდოსკოპიური ან ტომოგრაფიული გამოკვლევების დროს. ქირურგიული ჩარევებისას ფლუორესცენტით შეღებილი უბნები ქირურგს ეხმარება ზუსტად განსაზღვროს ჯანმრთელი და დაავედბული ქსოვილები. [7]

ფლუორესცენტული ჰიბრიდიზაცია *in situ* (*fluorescence* in situ *hybridization* — **FISH**) წარმოადგენს ციტოგენეტიკურ მეთოდს, რომელიც გამოიყენება დნმ-ის სპეციფიური თანამიმდევრობის მდებარეობის განსაზღვრისა და დეტექციისათვის მეტამორფოზულ ქრომოსომებზე ან ინტერფაზურ ბირთვებში ***in situ*** **.** ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა დადგენილ იქნას გენების ექსპრესიის სივრცულ-დროითი თავისებურებები ცოცხალ უჯრედში და ქსოვილებში.

in situ ფლუორესცენტული ჰიბრიდიზაციის დროს იყენებენ დმ-ზონდებს, რომლებიც მოინიშნებიან კომპლემენტარული სამიზნეებით სინჯში. დნმ-ზონდების შედგენილობაში შედის ფლუოროფორებით მარკირებული ნუკლეოზიდები (პირდაპირი მონიშვნა) ან ისეთი კონიუგატებით, როგორიცაა ბიოტინი ან დიგოქსიგენინი (არაპირდაპირი მონიშვნა).

მანათობელი დნმ-ზონდების ვიზუალიზაცია ხდება ფლუორესცენტული მიკროსკოპის საშუალებით. ფლუორესცენტული სიგნალის ინტენსივობა დამოკიდებულია მრავალ ფაქტორზე - ზონდით მონიშვნის ეფექტურობაზე, ზონდის ტიპზე და ფლუორესცენტულ საღებავზე.[8]

დასკვნა

ანალიზის ფლუორესცენტური მეთოდები გამოირჩევა უნიკალური მგრძნობიარობით და სიიაფით. ბოლო დროს განსაკუთრებით იზრდება ფლუორიმეტრიის გამოყენების სფეროები, არეალი და პერსპექტივები. ფლუორესცენტული ანალიზის მეთოდებს აქვთ მთავარი დამოუკიდებელი მნიშვნელობა მრეწველობისათვის ფარმაცევტული პრეპარატების წარმოებაში, რამდენადაც ფუნქციონალური ანალიზის ჩატარება აუცილებელი და გარდაუვალი სტადიაა რთული ნარევების თვისებითი შედგენილობის განსაზღვრისათვის. ამიტომ ფარმაცევტული ანალიზის განვითრებისათვის სამკურნალო საშუალებების ხარისხის კონტროლისა და სტანდარტიზაციის საკითხებში ამ მეთოდების გამოყენება ძალიან აქტუალურია. ასევე მნიშვნელოვანია ფლუორესცენტური მეთოდების როლი ბიოლოგიასა და ბიომედიცინაში უჯრედშიდა ნივთიერებების შესწავლისა და მრავალი დავადების დიაგნოსტირებისათვის.

ამრიგად, ფლუორესცენციის მოვლენა და ანალიზის ფლუორესცენტული მეთოდები მნიშვნელოვანია სამეცნიერო კვლევებისათვის. ფლუორესცენტული მეთოდების დახვეწა და მათი გამოყენების არეალის გაზრდა მნიშვნელოვნად დააჩქარებს გამოკვლევებს სხვადასხვა სფეროში და ეს მეთოდები უდაოდ მომავლის მეცნიერების მეთოდებს მიეკუთვნება.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. [1] Joseph R. Lakowicz Principles of Fluorescence Spectroscopy. — Springer Science+Business Media, 2006. — ISBN 978-0-387-31278-1

2. [2] Bernard Valeur Molecular Fluorescence Principles and Applications. — Wiley-VCH Verlag GmbH. — ISBN 3-527-29919-X

3. [3] Millar, David P Fluorescence studies of DNA and RNA structure and dynamics // Current Opinion in Structural Biology 6 (1996) С. 322—326. DOI:10.1016/S0959-440X(96)80050-9.

4. [4] Royer, C. A. Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence // Chemical Reviews 106 (2006) (5) С. 1769—1784. DOI:10.1021/cr0404390.

5. [5] Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H., & Hood, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature, 321(6071), 674—679.

6. [6] Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., & Baumeister, K. (1987). A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. Science, 238(4825), 336—341.

7. [7] Schepartz, A.; Gonzalez, R. L. Molecular imaging: sine labore nihil // Current Opinion in Chemical Biology 15 (2011) С. 749—751. DOI:10.1016/j.cbpa.2011.11.001.

8. [8] ↑ *Ainsbury E. A., Bakhanova E., Barquinero J. F. et al.* (November 2011). «Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures». *Radiation Protection Dosimetry* **147** (4): 573—592. DOI:10.1093/rpd/ncq499. PMID 21183550.

9. [9] Н.В. Степанова, Т.В. Сеношенко, Н.А. Крамаренко, З.В. Татарникова ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ. Бийск Издательство Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова 2010

10. [10] Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский ФЛУОРИМЕТРИЯ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

    МЕТОДА ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА Учебное пособие Иркутск, 2013

ინტერნეტსაიტები:

11. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BB%D1%83%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%82%D0%BD%D0%B0%D1%8F_%D0%B3%D0%B8%D0%B1%D1%80%D0%B8%D0%B4%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F_in_situ

12. https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BB%D1%83%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D1%8F_%D0%B2_%D0%B1%D0%B8%D0%BE%D0%BB%D0%BE%D0%B3%D0%B8%D1%87%D0%B5%D1%81%D0%BA%D0%B8%D1%85_%D0%B8%D1%81%D1%81%D0%BB%D0%B5%D0%B4%D0%BE%D0%B2%D0%B0%D0%BD%D0%B8%D1%8F%D1%85