«ԻՆՏԵՐԱԿՏԻՎ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ
ԶԱՐԳԱՑՈՒՄ»
ՀԻՄՆԱԴՐԱՄ

ՀԵՐԹԱԿԱՆ ԱՏԵՍՏԱՎՈՐՄԱՆ ԵՆԹԱԿԱ ՈՒՍՈՒՑԻՉՆԵՐԻ ՎԵՐԱՊԱՏՐԱՍՏՄԱՆ ԴԱՍԸՆԹԱՑ 2023

ՀԵՏԱԶՈՏԱԿԱՆ ԱՇԽԱՏԱՆՔ

ԹԵՄԱ	«Վիտամին D_3 հակաօքսիդիչ հատկության ուսումնասիրությունը»
ԱՌԱՐԿԱ	Քիմիա
ՀԵՂԻՆԱԿ	Չախոյան Իզաբելլա
ՄԱՐԶ	Երևան
ՈՒՍՈՒՄՆԱԿԱՆ ՀԱՍՏԱՏՈՒԹՅՈՒՆ	«Շ. Շահամիրյան>> կրթահամալիր

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Ներածություն---------- 3

1. Գրական ակնարկ---------- 5

1.1. D վիտամինների հետազոտությունները և հայտնագործման պատմությունները---------- 5

1.2. Օրգանիզմում D վիտամինների ազդեցության մեխանիզմը և նրանց մետաբոլիզմը---------- 6

1.3. Կալցիումի տեղաշարժը աղիներում ---------- 7

1.4. D վիտամինների ակտիվ մետաբոլիտների կենսաբանական հատկությունները, իդենտիֆիկացիան և դուրս բերումը ---------- 7

1.5. D վիտամինների պահանջարկը և նրա պրեպարատների կլինիկական կիրառումը---------- 8

1.6. D վիտամինների սինթեզը: Պրովիտամին D–երի ֆոտոքիմիական իզոմերիզացի---------- 9

1.7. D վիտամինների ֆոտոքիմիական իզոմերիզացիան (ոչ հետադարձ ռեակցիաներ)---------- 10

1.8. D պրովիտամինների սինթեզի մեթոդը ըստ Վինդաուսի ---------- 11

2. Հիմնական մաս---------- 11

2.1 Կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիա ---------- 11

3. Մեթոդական մաս---------- 12

3.1. OH• ռադիկալների ռեակցիոնունակության քանակական որոշումը տարբեր միացությունների նկատմամբ---------- 12

4. Ուսումնասիրության արդյունքներ և Եզրակացություններ---------- 14

Օգտագործված գրականության ցանկ---------- 18

Ներածություն

D խմբի վիտամինները դասվում են ստերոիդային բնության կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների դասին և հանդիսանում են օրգանիզմում կալցիումի հոմեոստազի գլխավոր կարգավորիչներից մեկը: Նրանք լայնորեն կիրառվում են տարբեր ոսկրային հիվանդությունների բուժման համար, ինչպիսիք են ռախիտը, օստեոպարոզը, օստեոմալյացիան և այլն: D վիտամինները գտնվում է կարագի, մարգարինի, ձվի դեղնուցի, կաթի, պանրի մեջ: Չափազանց բարձր է դրա քանակները լյարդում, ձկներում և ծովային կենդանիների, հատկապես բրաձկան ճարպում: Թեև նշվեց, որ D վիտամինները պարունակվում են որոշ բնական աղբյուրներում, սակայն երբեմն անհրաժեշտություն է առաջանում D վիտամիններ օրգանիզմ ներմուծել սինթետիկ պրեպարատների տեսքով: Այդ պատճառով միայն D վիտամինների և նրանց ակտիվ անալոգների քիմիական սինթեզը կարող է բավարարել բժշկությունում և գյուղատնտեսությունում [1]:

Ազատ ռադիկալներն անկանոն մասնիկներ են, չզուգված էլեկտրոնով, ինչի արդյունքում դրանք խիստ ռակցիոնունակ են: Ազատ ռադիկալներն այս վիճակում սկսում են որսալ պրոտեիններ, ֆերմենտներ, լիպիդներ, անգամ՝ ամբողջական բջիջներ: Օրինակ, երբ ազատ ռադիկալը բախվում է բջջի պաշտպանիչ շերտին, այն քանդվում է՝ լիպիդներից առաջացած փշրանքները վերածելով նոր ազատ ռադիկալների: Վերջիններս նույնպես սկսում են անկանոն շարժվել և ամեն հաջորդ բախումից առաջացնել նոր ազատ ռադիկալներ: Այս պրոցեսը շարունակվում է անընդհատ: Այն հատվածում, որտեղ ազատ ռադիկալը քանդում է լիպիդային շերտը, առաջանում է ճեղք, ուր հեշտությամբ ներթափանցում են ազատ ռադիկալները և խախտում են բջջի ներքին կառուցվածվաքը: Եթե խոսենք մաշկի մասին, ապա այս դեպքում ազատ ռադիկալների պատճառով բջիջները ծերանում են: Բջջի կառուցվածքի ամբողջականությունը պահպանելու համար անհրաժեշտ է չեզոքացնել ազատ ռադիկալների բախումը պաշտպանիչ շերտին: Սրա համար օրգանիզմը կարիք ունի հակաօքսիդիչների: Մաշկի ծերացումը սկսում է, երբ բջիջները թուլանում են, և մաշկը դառնում է ավելի բարակ ու չոր: Սա շարունակական գործընթաց է, որը տեղի է ունենում թե՛ ներքին, և թե՛արտաքին պատճառների ազդեցությամբ: Այսպիսով, հակաօքսիդիչները մոլեկուլներ են, որոնք կանգնեցնում կամ դանդաղեցնում են անցանկալի օքսիդացումը: Հակաօքսիդիչները ստեղծում են լրացուցիչ պաշտպանիչ շերտ լիպիդների շուրջ և երբ տեղի է ունենում ազատ ռադիկալների բախում, վերջիններս վերացնում են հակաօքսիդիչի երկու բացասական մոլեկուլ և առանց վնասի հեռանում են:

Հետևյալ աշխատանքում նկարագրված են D վիտամինների հայտնագործման պատմությունը, նրանց սինթեզը և կառուցվածքային յուրահատկությունները: Հատուկ ուշադրություն է դարձվել D վիտամինների մետաբոլիզմի ուսումնասիրություններին և նրա կարգավորմանը: Նկարագրված են D վիտամինների կառուցվածքի կախվածության և նրանց կենսաբանական ակտիվության միջև եղած կապը:

Մանրամասն ներկայացված են D վիտամինների ֆոտոքիմիական իզոմերիզացման հետազոտության արդյունքները և բերված են տարբեր ֆոտոքիմիական փոխարկումների սխեմաներ: Տրված են D վիտամինների և պրովիտամինների համառոտ բնութագրերը: Նկարարված են D_2 և D_3 բյուրեղային վիտամինների բժշկությունում ստացման տեխնոլոգիա:

Աշխատանքի արդիականությունը: Աշխատանքի արդիականությունը կայանում է նրանում, որ ներկայումս լայնորեն վիտամին D_3-ը կիրառվում է և՛ բժշկության մեջ, և՛ որպես հավելանյութ: Կարևոր է իմանալ, թե ինչպես է վիտամին D_3-ի հակառադիկալային (հակաօքսիդացնող) ունակությունը:

Աշխատանքի նպատակը: Այս աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել վիտամին D_3-ի և OH ռադիկալների փոխազդեցությունը կինետիկական մեթոդով: Հաշվել վիտամին D_3 - OH ռեացիայի արագության հաստատունը:

1. ԳՐԱԿԱՆ ԱԿՆԱՐԿ

1.1. D վիտամինների հետազոտությունները և հայտնագործման պատմությունները

D վիտամինների հայտնագործման պատմությունը և ուսումնասիրությունները սերտորեն կապված են ռախիտի հետազոտման հետ, որը հնում լայն տարածված էր և հայտնի էր որպես աճող օրգանիզմի հիվանդություն: Այս հիվանդության նշաններն էին հանդիանում ոսկորների աճի խանգարումները և նրանց կակղումը, ողնաշարի վերին և ստորին վերջույթների կորացումը, կրծքավանդակի կորացումը, որը կապված է օրգանիզմում կալցիումի հոմեոստազի խանգարման հետ:

Դեռ 1822թ.-ից ռախիտի բուժման համար «Կլինիկական բժշկություն» գրքում խորհուրդ է տրվել օգտագործել ձողաձկան լյարդի յուղը, իսկ մեկ այլ հետազոտող գրել էր արևային լույսի բուժական էֆեկտի մասին [1]:

1890թ –ին ռախիտի տարածումը կապում էին արևային լույսի պակասի հետ:

1905թ.–ին նկատեցին արևային լույսով ռախիտի բուժման դեպքեր:

1906թ.–ին ենթադրվում էր, որ ռախիտը պայմանավորված է սննդում «որոշակի կոմպոնենտների» բացակայության և ռախիտի պատճառները պետք է փնտրել սնվելու մեջ:

1924-1925թթ. ամերիկացի և անգլիացի գիտնականների միահամուռ ուժերով բացահայտեցին, որ խոլեստերինը ՈՒՄ- լույսով ճառագայթելիս ցուցաբերվում է հակառախիտային ազդեցություն [1]: Սակայն դիբրոմիդի միջոցով մաքրազատված խոլեստերինը կորցնում է այդ հատկությունը: Ենթադրվում էր, որ խոլեստերինը պարունակում է պրովիտամին, որը ճառագայթման դեպքում փոխարկվում է հակառախիտ վիտամինի: Երկարատև ուսումնասիրություններից հետո պարզվեց, որ D պրովիտամինը հանդիսանում է էրգոստերինը: Էրգոստերինի ճառագայթահարման աշխատանքները կապված էին մեծ դժվարությունների հետ, քանի որ առաջանում էր ցածր խտության հեշտ լուծվող խեժ, որը չէր բյուրեղանում և չէր հաջողվում այն բաժանել բաղադրամասերի: Այս ուսումնասիրությունները չընդհատվեցին այլ ճանապարհով էրգոստերինից D վիտամինների պրեպարատներ ստանալու նպատակով: Սկզբում փորձեցին էրգոստերինի վրա ազդել տեսանելի լույսով ֆոտոսենսիբիլիզատորների ներկայությամբ, օրինակ՝ էոզինի: Այդ դեպքում կախված ռեակցիայի ընթացքում թթվածնի առկայությունից ստանում էին կա՛մ պինակոն, կա՛մ էրգոստերի պերօքսիդ: Այս նյութերը չէին ցուցաբերում հակառախիտային հատկություն և հետաքրքրություն չէին ներկայացնում D վիտամինների ստացման համար: Հետագայում ուսումնասիրվեցին թերմիկ ռեակցիաները (250-300^0 C-ում) և էրգոստերինի տարբեր քիմիական փոխարկումները (օքսիդացում, հիդրատացում,

դեհիդրատացում, իզոմերիզացում)։ Արդյունքում ստացվել էին բյուրեղական շատ ածանցյալներ և մանրակրկտորեն ուսումնասիրվեցին էրգոստերինի քիմիական հատկությունները [2]։ Պարզվեց, որ այս բոլոր ածանցյալները չէին ցուցաբերում հակառախիտային ակտիվություն։ Սակայն, տարված հետազոտություններն օգնեցին բացահայտել էրգոստերինի կառուցվածքը։ Ոչ ֆոտոքիմիական եղանակով հակառախիտային միացության ստացման անհաջող փորձերը ստիպեցին նորից վերադառնալ էրգոստերինի ճառագայթմանը։ Առաջին աշխատանքները էրգոստերինի ֆոտոքիմիական փորձարկման և D վիտամինների անջատման ուսումնասիրությունները կատարվեցին 3 հիմնական կենտրոններում՝ Գերմանիայում, Անգլիայում և Հոլանդիայում [3]։

1.2 . Օրգանիզմում D վիտամինների ազդեցության մեխանիզմը և նրանց մետաբոլիզմը

D վիտամինների կենսաբանական հատկությունների ուսումնասիրության բարդությունները կայանում են նրանում, որ D վիտամինների այն քանակությունները, որոնց արձագանքում են կենդանիները, շատ չնչին է և այդ պատճառով անհրաժեշտ են նրանց հայտնաբերման գերզգայուն մեթոդներ[4]։

Չնայած նրան, որ D վիտամինների ազդեցության մեխանիզմի և մետաբոլիզմի հետազոտության ուսումնասիրությունները կատարվել են 40-ական և 50-ական թվականներին, նշակիր պրեպարատների բավական բարձր տեսակարար ակտիվությունը, անջատման և անալիզի մեթոդների ֆիզիոլոգիական դոզաների հետ աշխատանքի դեպքում թույլ չէին տալիս հայտնաբերել D վիտամինների ակտիվ կենսաբանական մետաբոլիտներ։ Արդյունքում արվել էր սխալ եզրահանգում այն մասին, որ D վիտամինների ազդեցությունն օրգանիզմում կապված չէ նրանց մետաբոլիկ փոփոխությունների հետ։ Միայն 60-ականների սկզբին վերսկսվեցին հետազոտությունները, որոնք բերեցին D վիտամինների ազդեցության մեխանիզմն ու մետաբոլիզմի պարզաբանումը[3]։

Օրգանիզմի նորմալ զարգացման և գործունեության համար մշտապես անհրաժեշտ է արյան մեջ կալցիումի մշտական կոնցենտրացիա։ Այն արյուն է հասնում աղիների պատերի միջոցով սննդում եղած կալցիումը ներծծվելով ինչպես նաև կմախքի ոսկրային հյուսվածքից կալցիումի մոբիլիզացմամբ։ Հիմնական նյութը, որը մշտապես պատասխանատու է այդ պրոցեսի համար D վիտամիններն են։

Համաձայն ժամանակակից պատկերացումների, օրգանիզմում D վիտամինների անբավարարության դեպքում տեղի են ունենում վիտամինի հետևյալ հիմնական

փոփոխությունները. աղիներից կալցիումի և ֆոսֆորի ներծծման խանգարումներ, ոսկրային հյուսվածքից կալցիումի մոբիլիզացման ունակության խանգարումներ, արյան պլազմայում կալցիումի և ֆոսֆորի կոնցենտրացիայի անկանոն նվազումներ, ոսկրային հյուսվածքի սնուցման խանգարումներ, որի հիմքում ընկած է պաթո-մորֆոլոգիական պատկերը, երիկամային կանալներում անօրգանական ֆոսֆատի ռեաբսորբցիայի նվազեցում:

1.3. Կալցիումի տեղաշարժը աղիներում

Դեռ 30-ական թվականներին հայտնի էր, որ ռախիտի դեպքում խախտվում է աղիներում կալցիումի ներծծումը և որ D վիտամինները բարձրացնում են նրա
աբսորբցիան ռախիտային կենդանիների աղիներում: in vivo և in vitro փորձերով ցույց է տրված [2, 3, 4], որ կալցիումի ներծծումը աղիներում տեղի է ունենում ինչպես դիֆուզիայի ճանապարհով (կոնցենտրացիայի գրադիենտով), այնպես էլ ակտիվ տեղաշարժով (կոնցենտրացիայի գրադիենտին հակառակ) և որ աղիների պատերի միջոցով կալցիումի տրանսպորտի պրոցեսի համար անհրաժեշտ են թթվածին և էներգետիկական սուբստրատ:

Վիտամին D_3-ի ազդեցության մեխանիզմը և հատկապես նրանց դերը աղիներում կալցիումի գործում հասկանալու համար մեծ նշանակություն ունի 1966 թվականին կատարված հայտնագործությունները [5]: Նրանք ցույց տվեցին, որ ռախիտով հիվանդ կենդանիներին վիտամին D_3 ներարկելով թիրախ-հյուսվածքներում դրսևորվեցին սպեցիֆիկ կալցիում կապող սպիտակուցների ի հայտ գալու երևույթներ, որոնք բացակայում էին ռախիտ կենդանիների մոտ: Կալցիում կապող սպիտակուցը հայտնաբերվել էր հաստ աղու բոլոր հատվածներում և երիկամներում: Հավերի մոտ կալցիում կապող սպիտակուցների առաջացման ուսումնասիրության դեպքում վիտամին D_2-ի և D_3–ի ազդեցությամբ պարզվել է, որ վերջիններս ավելի էֆեկտիվ են կալցիում կապող սպիտակուցի սինթեզում, որը համապատասխանում է վիտամին D_2-ի և D_3–ի ֆիզոլոգիական էֆեկտին:

1.4. D վիտամինների ակտիվ մետաբոլիտների կենսաբանական հատկությունները, իդենտիֆիկացիան և դուրս բերումը

D վիտամինների ազդեցության մեխանիզմի լուսաբանման դեպքում առաջին հերթին անհրաժեշտ էր պարզել, արդյոք ենթարկվում են սրանք օրգանիզմում մետաբոլիկ փոփոխությունների [3,5,6] : Եվ չնայած, որ երկար ժամանակ կարծում էին, որ D վիտամինները չեն փոփոխվում օրգանիզմում, շատ գործոններ հերքում էին այդ ենթադրությունները:

D վիտամինների մետաբոլիզմի ուսումնասիրման պատճառներից մեկը հանդիսանում են տվյալները այն մասին, որ վիտամինների ներմուծման և ազդեցության սկզբի միջև գոյություն ունի լագ-պարբերություն (4-12 ժամ առնետների համար, 12-18 ժամ հավերի համար), որն անհրաժեշտ է թիրախ-հյուսվածքներին վիտամին հասցնելու համար կամ էլ վիտամին D_3-ի մոլեկուլի մետաբոլիկ ձևափոխման ակտիվ ձևին:

Այս հարցերի լուծման համար 60-ականների սկզբին գլխավոր դեր խաղացին հետևյալ հանգամանքները [5].

- բարձր տեսակարար ակտիվությամբ ռադիոակտիվ D_3 վիտամինի սինթեզը թույլ տվեց իրականացնել ֆիզոլոգիական դոզաներով D_3 վիտամինի հետ կապված մետաբոլիզմի ուսումնասիրություններ
- նրբաշերտային և սյունային քրոմատոգրաֆիաների նոր մեթոդների մշակումները թույլ տվեցին առանձնացնել և հետազոտել վիտամին D_3–ի մետաբոլիտներ
- գեր թույլատրելի մասս- և ՄՄՌ- սպեկտրոսկոպիաները թույլ տվեցին իդենտիֆիկացնել մետաբոլիտների կառուցվածքը:

1.5. D վիտամինների պահանջարկը և նրա պրեպարատների կլինիկական կիրառումը

D վիտամինների տարածվածությունը բնական աղբյուրներում շատ սահմանափակ են: Կանաչ բույսերում ընդհանրապես չի պարունակվում: Սակայն գոյություն ունեն տվյալներ, որ կակաոյի պտուղները, որոշ բույսեր, խմորիչները ունեն հակառախիտային ակտիվություն, ինչը հավանաբար պայմանավորված է նրանցում D պրովիտամինների առկայությամբ, որոնցից արևային ճառագայթների ազդեցության ներքո առաջանում են D վիտամինների փոքր քանակություններ կամ այլ հակառախիտային միացություններ [7]: Կենդանի օրգանիզմներում D վիտամինները հայտնաբերված են շատ չնչին քանակություններով: Ավելի հարուստ են D վիտամիններով որոշ տեսակի ձկների լյարդը, հատկապես թունոսի, տափակաձուկը, կետի լյարդը, թռչունների ձվերը: Այդ պատճառով մարդու, գյուղատնտեսական կենդանիների և թռչունների D վիտամինների հանդեպ ունեցած պահանջարկը բավարարվում է հիմնականում սինթետիկ պրեպարատների միջոցով: D վիտամիններից այժմ լայն կիրառություն ունեն D_2 և D_3 վիտամինները երեխաների մոտ ռախիտի կանխարգելման և բուժման նպատակով, ինչպես նաև մեծահասակների մոտ կալցիումի և ֆոսֆորի նյութափոխանակության խանգարումը կանխարգելելու նպատակով [1,4]:

Որոշել հասուն մարդու օրգանիզմի D վիտամինների հանդեպ ունեցած պահանջարկը բավական դժվար է, քանի որ օրգանիզմում արևային ճառագայթների ազդեցության ներքո մաշկում եղած 7-դեհիդրոխոլեստերինից առաջանում է վիտամին D_3:

D վիտամինների մետաբոլիզմի և ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրությունները բացեցին նոր հնարավորություններ կլինիկական բժշկությունում օգտագործելով D_3 վիտամինի մետաբոլիտները և անալոգները: D վիտամինների ազդեցության մեխանիզմների ուսումնասիրությունների դեպքում պարզվեց, որ նախքան իրենց ազդեցություն ցուցաբերելը, նրանք պետք է փոխարկվեն կենսաբանորեն ակտիվ տեսքի: Սկզբում D վիտամինները փոխարկման ենթարկվում են լյարդում, որտեղ 25–հիդրոքսիլացման արդյունքում առաջանում է 25-OHD_3: Հետագա հիդրոքսիլացման ճանապարհին երիկամներում 25-OHD_3–ը փոխարկվում է հիմնական մետաբոլիտին՝ 1α, 25-$(OH)_2D_3$-ի, որն իրենից ներկայացնում է D_3 վիտամինի հորմոնալային տեսքը:

Լյարդի և երիկամների խրոնիկական հիվանդությունների դեպքում խախտվում է D_3 վիտամինի փոխարկումը նրա կենսաբանական ակտիվ տեսքի, որը բերում է օրգանիզմում կալցիումի հոմեոստազի խախտման, որի հետևանքով առաջանում են այնպիսի ոսկրային հիվանդություններ, ինչպիսիք են ռախիտը, օստեոպարոզը, օստեոմալիացիան, օստեոդիստրոֆիան: Այս հիվանդությունների բուժման նպատակով կլինիկական պրակտիկայում սկսել են հաջողությամբ օգտագործել 25- OHD_3 և 1α, 25-$(OH)_2D_3$:

1.6. D վիտամինների սինթեզը: Պրովիտամին D–երի ֆոտոքիմիական իզոմերիզացի

20-րդ դարի վերջերին հաստատվեց, որ էրգոստերինի վրա ՈՒՄ- լույսի ազդեցությունից առաջանում է D վիտամիներ: Ցույց է տրվել, որ դա խիստ բարդ պրոցես է, որի ընթացքում առաջանում է ոչ պակաս, քան 5-6 միացություն, այդ իսկ պատճառով D վիտամինների տարանջատումը խառնուրդից, որը ստացվել է էրգոստերինի ֆոտոիզոմերիզացիայից, կապված է խիստ մեծ դժվարությունների հետ: Էրգոստերինի փոխարկման աստիճանի մեծացմանը զուգընթաց խառնուրդի կազմը բարդանում է [8]:

1931-1932թթ. վիտամին D_1-ից անջատվեց վիտամին D_2-ին իզոմեր ֆիզիոլոգիապես ոչ ակտիվ սպիրտ՝ լյումիստերին, իսկ էրգոստերինի ֆոտոիզոմերիզացիայից ստացված խառնուրդից մեկ այլ իզոմեր՝ տախիստերին [8]:

Հետագայում պարզվեց, որ լյումիստերինը մագնեզիումի բռնկումից առաջացած ճառագայթների ազդեցությունից առաջացնում է տախիստերին: Հիմք ընդունելով ստացված

արդյունքները առաջարկվեց հաջորդաբար ընթացող ֆոտոքիմիական փոխարկումների հետևյալ սխեման (տես Հավելված 1 , գրաֆիկ 1)

Անցումը E-ից L_2, L_2-ից T_2, T_2-ից D_2 և շարունակ հանդիսանում է ոչ դարձելի ֆոտոքիմիական պրոցեսներ: Այս սխեման առաջացրեց որոշ հակասական կարծիքներ, մինչև որ 1949թ. ֆրանսիական հետազոտողները առանձնացրեցին էրգոստերինի ֆոտոքիմիական իզոմերիզացիայի նոր վերջնանյութ՝ պրեկալցիֆերոլ 2 (կամ պրեվիտամին 2) և ցույց տվեցին, որ հենց սա է հանդիսանում վիտամին D_2–ի նախատիպը, ընդ որում պրովիտամինի փոխարկումը վիտամինի տեղի է ունենում ոչ թե ֆոտոքիմիական ճանապարհով, այլ թերմիկ իզոմերիզացիայով: Այս արդյունքների հիման վրա առաջարկվեց ձևափոխման նոր սխեմա [2] (տես Հավելված 1 գրաֆիկ 2):

Միաժամանակ հաստատվեց, որ էգոստերինի ուղղակի փոխարկումը լյումիստերինի քիչ հավանական է: Համընդհանուր ընդունված D պրովիտամինների ֆոտոքիմիական սխեման տրվեց վերանայման: Հետագայում պարզ դարձավ, որ պրովիտամինի վրա ՈՒՄ-ճառագայթներով ազդելիս առաջանում են էգոստերին, լյումիստերին և տախիստերին: Այս տվյալներր հիման վրա 1955թ.-ին առաջարկվեց նոր սխեմա, համաձայն որի պրովիտամինը հանդիսանում է էրգոստերինի ֆոտոփոխարկումների համար որպես վերջնանյութ - նախանյութ (տես Հավելված 1 Գրաֆիկ 3):

Հետագայում առաջարկեցին որոշ այլ մեխանիզմներ, որոնց հիման վրա հնարավոր եղավ բացատրել էրգոստերինից լյումիտերինի առաջացումը:

Պրովիտամին D_3-ը առանձնացվեց 7-դեհիդրոխոլեստերինի ճառագայթման արգասիքների խառնուրդից: Այս պրովիտամինի կենսաբանական ակտիվությունը ուսումնասիրելով պարզվեց, որ այս պրովիտամինը հակառախիտային ակտիվություն չունի կամ ունի աննշան քանակությամբ [8,9]:

1.7. D վիտամինների ֆոտոքիմիական իզոմերիզացիան (ոչ հետադարձ ռեակցիաներ)

ՈՒՄ– լույսով ճառագայթումը առաջացնում է D վիտամինների կառուցվածքի ոչ հետադարձ փոփոխություններ և մի շարք նոր միացությունների առաջացումը [9]:

Դրանցից առաջինը ստացվել են սուպրաստերիններ I և II-ը:

ՈՒՄ– լույսով ճառագայթումից, մինչև 180^{0}C տաքացումից և վերականգնումից (Na+սպիրտ) սուպրաստերին I-ը չի փոխվում: Պարզվել է որ սուպրաստերին I-ը ունի (XI) կառուցվածքը: Այն հակառախիտային ակտիվություն չունի և նրա շեմային տոկսիկությունը 1 մգ: Սուպրաստերին II-

ը էրգոստերինի նման ունի հիդրոքսիլային խումբ, կողմնային շղթա։ Սուպրաստերին II-ը ունի (XII) կառուցվածքը։ Սուպրաստերին II-ը ֆիզիոլոգիապես ակտիվ չէ։

ՈՒՄ- լույսով վիտամին D_2–ի ճառագայթման դեպքում առանձնացվել է սուպրաստերին III։ Սրա կառուցվածքը որշված չէ [9]։

1.8. D պրովիտամինների սինթեզի մեթոդը ըստ Վինդաուսի

Առաջին անգամ պրովիտամին D_3-ի 7-դեհիդրոխոլեստերին (7-ԴՀԽ) սինթեզը իրականացվել է Վինդաուսի կողմց, որպես ելանյութ վերցվել է խոլեստերինը [10]։ Երկու ստերինները միմյանցից տարբերվում են միայն հավելյար կրկնակի կապի առկայությամբ, որը գտնվում է 7-ԴՀԽ մոլեկուլի C_7-C_8 ատոմների միջև։ Խոլեստերինի ացիլացումից հետո, ացետատը օքսիդացվել է քրոմային անհիդրիդով 90%-ոց CH_3COOH–ի միջավայրում, մինչև 7–կետոածանցյալի։ Ալյումինի իզոպրոպիլատով սպիրտի միջավայրում վերականգնումը և սպիրտային հիմքով օճառացումը տալիս է 7α- և 7β- օքսիխոլեստերինային ստերիոիզոմերների խառնուրդ, որը բենզոլացվել է դիբենզոատները ենթարկվել են տաքացման 200^0C–ում։ Ինչպես հաստատվեց հետագայում բենզոյական թթվի քայքայումից առաջանում է 7-ԴՀԽ բենզոատ, իսկ մյուսից բացի դրանից ստացվել է նաև խոլեստա-6, 8, (9) – դիեն - 3β-օլա- իզոդեհիդրոխոլեստերինի բենզոատ։ Սպիրտային հիմքով 7-ԴՀԽ բենզոատի օճառացումից առաջանում է 7-ԴՀԽ։

2. ՀԻՄՆԱԿԱՆ ՄԱՍ

2.1. Կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիա

Կլանման էլեկտրոնային սպեկտրոսկոպիայի հիմքում ընկած է նյութի կողմից սպեկտրի տեսանելի կամ ուլտրամանուշակագույն տիրույթներում ճառագայթման կլանումը, որը պայմանավորված է մոլեկուլում էլեկտրոնային անցումներով։ Նյութի կողմից այդ տիրույթներում էլեկտրամագնիսական ճառագայթի կլանումը բերում է կլանման շերտերի առաջացման, որոնք օպտիկական խտության կամ կլանման մոլային գործակցի գրաֆիկական բաշխումներն են ըստ ալիքի երկարությունների կամ հաճախությունների և կոչվում են էլեկտրոնային սպեկտրներ։ Սպեկտրալ տվյալները գրանցվում են որպես կլանման գործակցի ֆունկցիա ալիքի երկարությունից կամ հաճախությունից, այսինքն արտահայտվում են ինտենսիվության և ալիքի երկարության փոփոխականների միջոցով։ Նյութի շերտի միջով անցնելիս (մասնավոր դեպքում լուծույթի) I_0 ինտենսիվությամբ լուսային փունջն ի հաշիվ նյութի շերտում նրա կլանման,

անդրադարձման, ցրման և այլ երևույթների, կունենա ավելի փոքր I ինտենսիվության արժեք։ Լուսային փնջերի այդ ինտենսիվությունների կապը տրվում է Բուգեր-Լամբերտի օրենքով.

$$I=I_0\exp(-ac\ell)$$

Կլանող լուծույթի կոնցենտրացիայի և օպտիկական խտության միջև կապը տրվում է Բերի օրենքով ըստ որի լուծույթի օպտիկական խտությունն ուղիղ համեմատական է լուծված նյութի կոնցենտրացիային՝ շերտի անփոփոխ հաստության պայմաններում.

$$D = KC$$

որտեղ՝ K-ն համեմատականության գործակիցն է, C-ն՝ լուծված նյութի կոնցենտրացիան։ Ընդհանրացված ձևով Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը կարելի է ձևակերպել հետևյալ կերպ. լուծված նյութի ամեն մի մոլեկուլ /իոն/ կլանում է մոնոքրոմատիկ լույսի որոշակի մասը։ Լուծված նյութի կոնցենտրացիան մեծացնելիս լուծույթի միջով անցնող ճառագայթի ինտենսիվությունը նվազում է էքսպոնենցիալ օրենքով, իսկ օպտիկական խտությունը գծայնորեն մեծանում է կոնցենտրացիայի աճի հետ։

$$I = I_0\, e^{-kc\ell}$$

Որտեղ՝ K-ն լուսակլանման գործակիցն է, որը կախված է լուծված նյութի բնույթից և ճառագայթի ալիքի երկարությունից։

Եթե կոնցենտրացիան (C) արտահայտված է մոլերով լիտրում(մոլ/լ), իսկ շերտի հաստությունը (ℓ) սմ-ով, ապա K-ն իրենից ներկայացնում է լուսակլանման մոլյային գործակից (ε_λ) կամ էքստինքցիա, իսկ Բուգեր-Լամբերտ-Բերի օրենքը (լուսակլանման հիմնական օրենք) արտահայտվում է հետևալ բանաձևով.

$$D = \varepsilon_\lambda cl \quad \text{կամ} \quad \varepsilon_\lambda = D/cl$$

3. ՄԵԹՈԴԱԿԱՆ ՄԱՍ

3.1. OH• ռադիկալների ռեակցիոնունակության քանակական որոշումը տարբեր միացությունների նկատմամբ

Ուսումնասիրվում է ջրային միջավայրում *OH*• ռադիկալների մրցակցային փոխազդեցությունները հետազոտվող միացության և ռադիկալային թակարդի հետ՝ պարզելու համար միացությունների հակառադիկալային հատկությունը[11]։

Ջրային միջավայրում նյութերի քիմիական փոխարկումներն ուսումնասիրելիս մեծ ուշադրություն է դարձվում ազատ ռադիկալների և H_2O_2-ի մասնակցությամբ ընթացող ռեակցիաներին։ Ջրային միջավայրում առկա շատ օրգանական նյութերը թթվածնի

ներկայությամբ առաջացնում են $O_2^{\cdot-}$ ($HO_2^{\bullet}$) ռադիկալներ, որոնք կա՛մ միանում են իրար՝ առաջացնելով H_2O_2, կա՛մ էլ փոխազդում են ջրում լուծված նյութերի հետ: Բացի $O_2^{\cdot-}$ ($HO_2^{\bullet}$) ռադիկալներից փոխազդեցության արդյունքում առաջանում են $OH^{\bullet}$ ռադիկալներ, որոնք ավելի արդյունավետ օքսիդիչներ են ջրում լուծված օրգանական և անօրգանական նյութերի համար:

Արեգակնային լույսի ազդեցությամբ ընթանում են տարբեր ֆոտոքիմիական փոխարկումներ, որոնց արդյունքում գոյանում են ակտիվ ագենտներ՝ H_2O_2, OH և HO_2 ռադիկալներ, սինգլետ թթվածին և սոլվատային էլեկտրոն: Նյութերի քիմիական և ֆոտոքիմիական փոխարկումները ուսումնասիրելիս մեծ ուշադրություն է դարձվում ռադիկալային պրոցեսներին, որոնք ընթանում են առաջացող ազատ ռադիկալների, մասնավորապես, OH ռադիկալների մասնակցությամբ: Ունենալով բարձր վերօքս պոտենցիալ՝ OH ռադիկալը ունի լավ օքսիդացնող հատկություն:

Տարբեր տիպի նյութերի (օրգանական, անօրգանական) օքսիդացումը ազատ ռադիկալների միջոցով կարելի է իրականացնել մեթոդով, որը հիմնված է պարանիտրոզոդիմեթիլանիլին (ՊՆԴՄԱ) ներկանյութի OH ռադիկալներով մրցակցող օքսիդացման վրա թորած ջրում և ուսումնասիրվող միացության ներկայությամբ:[11,12]:

Սխեմատիկորեն ռեակցիան կարելի է պատկերել հետևյալ ձևով (տես Հավելված 1 գրաֆիկ 4).

Թորած ջրում ռադիկալները փոխազդում են ՊՆԴՄԱ ներկանյութի և H_2O_2 -ի հետ, որի արդյունքում լուծույթը գունազրկվում է: Լուծույթի գունազրկման արագությունը թորած ջրում համընկնում է ռադիկալների հարուցման արագության հետ: ՊՆԴՄԱ-ի գունազրկման արագությունը փոքրանում է՝ ի հաշիվ OH ռադիկալների հետ մրցակցող փոխազդեցության: ՊՆԴՄԱ-ն օգտագործվում է որպես $OH^{\bullet}$-ի մրցակից ակցեպտոր: H_2O_2-ի ֆոտոլիզը իրականցվել է λ=313նմ ալիքի երկարության տակ օգտագործելով հատուկ ֆիլտր: Տեղի է ունենում մրցակցող փոխազդեցություն ներկանյութ + $OH^{\bullet}$ և միացություն+ $OH^{\bullet}$ ռեակցիաների միջև:

H_2O_2-ի ֆոտոլիզի արդյունքում իրականացվում է OH ռադիկալների հարուցում ՈւՄ ճառագայթման ազդեցության տակ[11]: ՊՆԴՄԱ-ի կոնցենտրացիան որոշվում է ֆոտոկոլորիմետրի օգնությամբ λ= 440նմ ալիքի երկարության տակ: Չափումները կատարվում են [ՊՆԴՄԱ]=f(t) կախվածության գծային տիրույթում: Ռեակցիոն միջավայրի pH-ը պահպանվում է հաստատուն:

Ստացված արդյունքների հիման վրա կառուցում են D=f(t) գրաֆիկը: Ուսումնասիրվող նյութի (P) տարբեր կոնցենտրացիաների դեպքում ստացված D=f(t) կախվածություններից հաշվում են

թեքության անկյան տանգենսը, որը փաստորեն ռեակցիայի առագությունն է՝ W-ն, ապա կառուցում W=f([P]) կախվածությունը և հաշվում OH ռադիկալների հետ փոխազդեցության արագության հաստատունը ըստ հետևյալ հավասարման.

$$k_{OH+P}=1.25\cdot10^{10}([ՊՆԴՄԱ]/[D_3])\cdot[(W_1/W_2)-1],\ մոլ^{-1}\cdot լ\cdot վրկ^{-1}$$

որտեղ [**D3**]-ն վիտամին D3-ի սկզբնական կոնցենտրացիաներն են (10^{-6}-10^{-3} մոլ/լ), $\varepsilon_{ՊՆԴՄԱ} = 3.4\cdot10^4$, $1.25\cdot10^{10}$-ը $\dot{O}H + ՊՆԴՄԱ$ ռեակցիայի արագության հաստատունն է (k_{OH}), W_1 և W_2-ը՝ համապատասխանաբար վիտամին D3-ի բացակայությամբ և ներկայությամբ ընթացող ռեակցիաների արագություններն են, ընդ որում W_2-ը բեկման կետին համապատասխանող արագությունն է:

Օրգանական նյութերի մեծ մասի համար k_{OH+P} արժեքները ընկած են 10^8-10^{10} Մ$^{-1}$ վրկ^{1} տիրույթում:

Նկ. 1-ում տրված է վիտամին D3-ի $OH^{\bullet}$ ռադիկալների հետ փոխազդելու ունակությունը (տես Հավելված 2 նկար 1): Այս նպատակով կատարել ենք ուսումնասիրվող նյութի տարբեր կոնցենտրացիաների և $OH^{\bullet}$ ռադիկալների փոխազդեցությունների կինետիկական ուսումնասիրությունը: ՊՆԴՄԱ-ի գունազիկման արագությանը հետևելով՝ կախված վիտամին D3-ի կոնցենտրացիայից:

4. ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐ ԵՎ ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1 Զրոյական լուծույթ (C_{D_3} = 0), 2 C_{D_3} = 1.1Ē 10^{-6} Մ, 3 C_{D_3} = 2.8Ē 10^{-6} Մ,
4 C_{D_3} = 5.6Ē 10^{-6} Մ, 5 C_{D_3} = 1.1Ē 10^{-5} Մ, 6 C_{D_3} = 2.8Ē 10^{-5} Մ,7C_{D_3} = 5.6Ē 10^{-5} Մ,
8C_{D_3} = 1.1Ē 10^{-4} Մ, 9 C_{D_3}= 5.6Ē 10^{-4} Մ,10C_{D_3} = 1.1Ē 10^{-3} Մ

Նկ. 1-ում տրված վիտամին D3-ի տարբեր կոնցենտրացիաների և $OH^{\bullet}$ ռադիկալների փոխազդեցության կինետիկական կորերից ստացել ենք թեքության անկյան տանգենսները(tgα-ները), որը փաստորեն ռեակցիայի առագությունն է՝ W-ն, ապա կառուցում W=f([D3]) կախվածությունը: Ելնելով նկ.1-ից կառուցում ենք նկ.2-ը, որից ստանում ենք բեկման կետին համապատասխանող արագությունը՝ W_2 (տես Հավելված 2 նկար 2):

Նկ.2-ում տրված է tgα-ի (հաշված նկ. 1-ից) կախվածությունը վիտամին D3-ի կոնցենտրացիայից: Նկ.1-ից և նկ.2-ից հաշվում ենք վիտամին D3 և $\dot{O}H$ ռադիկալների ռեակցիայի արագության հաստատունը հետևյալ բանաձևով. [13,14]

$$K_{OH^{\cdot}+D_3} = 1.25 \cdot 10^{10}([\text{ՊՆԴՄԱ}]/[D_3]) \cdot [(W_1/W_2)-1],\ \text{մոլ}^{-1}\cdot\text{լ}\cdot\text{վրկ}^{-1}$$

Ստացվում է՝ $K_{OH^{\cdot}+D_3} = 1{,}2129 \cdot 10^7$ մոլ$^{-1}$·լ·վրկ$^{-1}$

Այսպիսով կարելի է կատարել հետևյալ եզրակացությունները.

1. Մրցակցային ռեակցիայի մեթոդով ցույց ենք տվել, որ վիտամին D_3-ն ունի հակառադիկալային հատկություն:
2. Կինետիկական մեթոդով ստացել ենք վիտամին D_3-ի OH ռադիկալների հետ փոխազդեցության ռեակցիայի արագության հաստատունը՝

   $K_{OH^{\cdot}+D_3} = 1{,}2129 \cdot 10^7$ մոլ$^{-1}$·լ·վրկ$^{-1}$

Հավելված 1

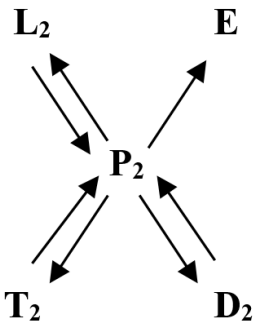
Էրգոստերին (E) ⟶ լյումիստերի (L_2) ⟶ տախիստերին(T_2) ⟶

⟶ վիտամինD$_2$(D$_2$) ⟶ սուպրաստերին I և II / ոտոքսիստերին

Գրաֆիկ 1

$$E \longrightarrow L_2 \longrightarrow T_2 \longrightarrow P_2 \longrightarrow D_2$$

Գրաֆիկ 2



Գրաֆիկ 3

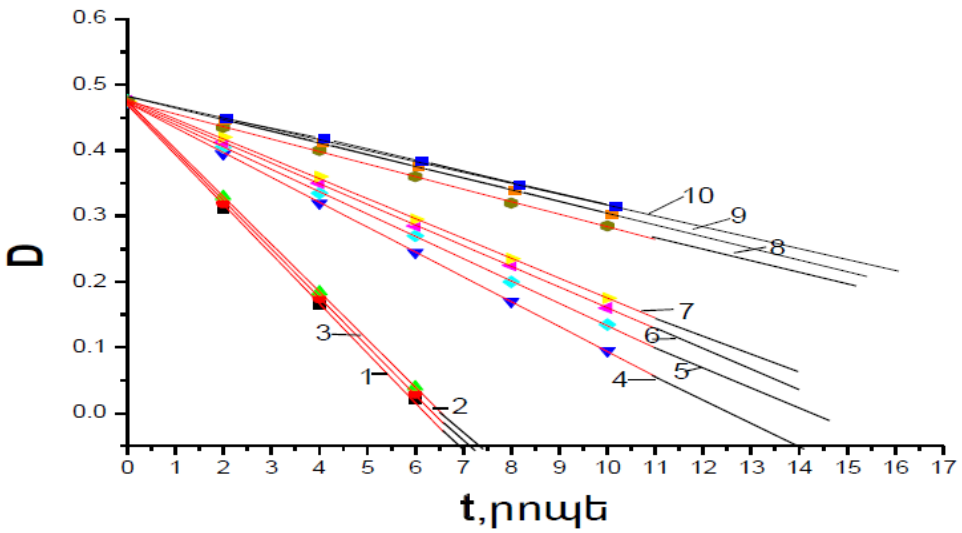
$$H_2O_2 \xrightarrow{h\upsilon} 2\dot{O}H$$

$$\dot{O}H + \text{ՊՆԴՄԱ} \xrightarrow{k_{\dot{O}H}} \text{ներկանյութի գունազրկում}$$

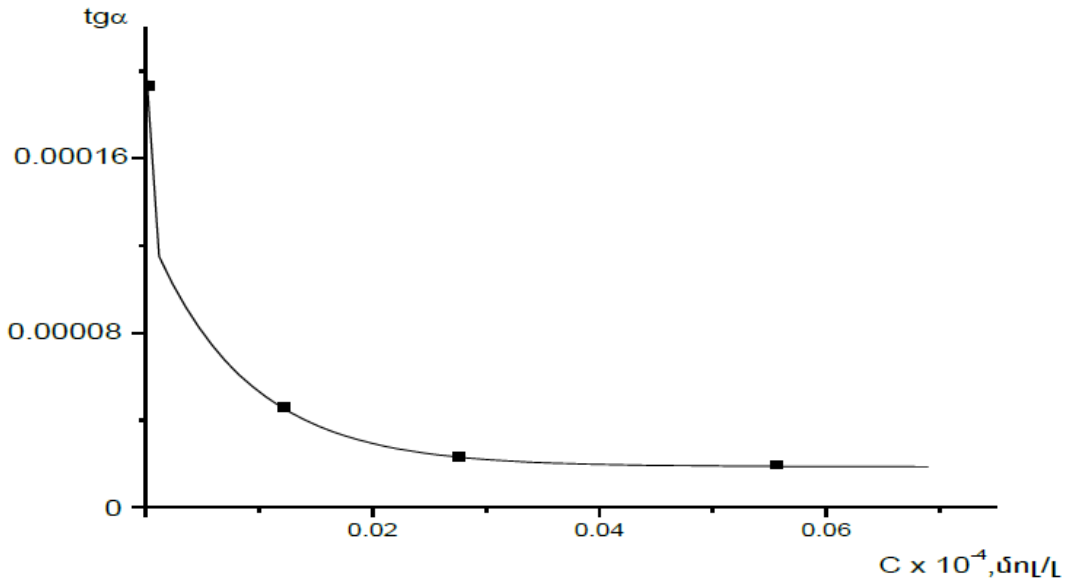
$$\dot{O}H + \text{ՊՆԴՄԱ}+P \xrightarrow{k_{\dot{O}H+P}} \text{ներկանյութի գունազրկում}$$

Գրաֆիկ 4

Հավելված 2



Նկ.1 ՊՆԴՄԱ-ի օպտիկ խտության կախվածությունը ՈՒՄ-ճառագայթման ժամանակից (λ=313 նմ), վիտամին D3-ի ներկայությամբ:



Նկ. 2. tgα-ի (հաշված նկ. 1-ից) կախվածությունը վիտամին D3 -ի կոնցենտրացիայից:

ՕԳՏԱԳՈՐԾՎԱԾ ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՑԱՆԿ

1. Б. В. Спиричев. Витамины D – М. Аст. Пресс 2011. 156 ст.
2. Gerald F. Combs, Jr. Chapter . What is a Vitamin? The Vitamins. — Academic Press, 2012. — 598 с. — ISBN 978-0-12-381980-2
3. Վ. Ա. Դևյատկին, Ռ.Ի. Յախիմովիչ և ուրիշներ – Արդյունաբերությունում - D վիտամինների քիմիա, 1978. Կիև, էջ 211
4. Վիտամինների քիմիական անալիզի մեթոդները 1962, 100 էջ
5. Reynolds, James E. F. Martindale: The Extra Pharmacopoeia. — Pennsylvania, 1993. — Vol. 30. — ISBN 0-85369-300-5. pages 1314-1317
6. Takeuchi A, Okano T, Sayamoto M, Sawamura S, Kobayashi T, Motosugi M, Yamakawa T.Tissue distribution of 7-dehydrocholesterol, vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in several species of fishes. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1986 Feb:32(1):13-22
7. Katsuji Takada, Atsuko Takashima, Tadashi Kobayashi and Yasuko Shimoi Application of high-performance liquid chromatography to the stugy of esterified 7-dehydrocholesterol in rat skin. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid metabolism volume 666,Issue 3, 23December 1981, pages 307-312
8. Atsuko Takeuchi, Toshio Okano, Mayumi Torii, Yumi Hatanaka and Tadashi Kobayashi Comparative studies on the contents of vitamin D3 25- hydroxyl vitamin D3 and 7-dehydrocholesterol in fish liver. Comparative Biochemistry and Physiology Past B:Biochemistry and Molecular Biology Volume 88, Issue 2, 1987, Pages 569-573
9. Brigelius-Flohé R, Traber MG (July 1999). «Vitamins: function and metabolism». FASEB J. 13 (10): 1145–55. PMID 10385606
10. John P. Moody, Carl A Humphries, Stella M. Allan and Colin R. Paterson. Determination of 7-dehydrocholesterol in human skin by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications Volume 530, 1990, Pages 19-27
11. А.И. Мартирян, П.С.Гукасян, Г.Л.Григорян О природе промежуточного соединения в реакции ZnO + H2O2, ЕГУ, Жур. физ. химии 2007, ст. 1379-1384.
12. A.I.Martiryan,Galstyan A.S.Grigoryan K.R. Ghazaryan A.G. Synthesis of Carvone-Derived 1,2,3-Triazoles Study of Their Antioxidant Properties and Interaction with Bovine. *Molecules* 2018, *23*, 2991.

13. A.I. Martiryan, G.A. Shahinyan and V.V. Vardapetyan, *Antiradical activity, base-catalyzed hydrolysis and partition coefficients of some surfactants* Colloids Interface Sci. Commun. 2022, 50, 100653.
14. A.S. Masood, M.S. Ali, M.S. Manzar, N.A. Khan and A.H. Khan, 2 - Current situation of pharmaceutical wastewater around the globe, The Treatment of Pharmaceutical Wastewater Innovative Technologies and the Adaptation of Treatment Systems, Elsevier Inc., 2023, p. 454.