

İPƏK FİBROİNİNDƏ ULTRABƏNÖVŞƏYİ ŞÜALARIN TƏSİRİNDƏN YARANAN SƏRBƏST RADİKALLARIN REKOMBİNASİYASI İLƏ ZÜLALLARIN DİNAMİKASININ ÖYRƏNİLMƏSİ

RASİM B. ASLANOV, LƏMAN M. SÜLEYMANOVA

Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyası, Biofizika İnstitutu,

Azərbaycan, Bakı 1141, Z.Xəlilov küç.,117

Biofizikanın fundamental maraqlarından biri də biomolekulların strukturu, dinamikası və funksiyaları arasındakı qarşılıqlı əlaqədir. Zülalların dinamikası zaman və fəza miqyasında əhəmiyyətli dərəcədə dəyişir. Təqdim olunan məqalədə barəmə ipəyindən alınan fibroin zülalının dinamikasına nəmlənmənin təsiri öyrənilmişdir. Nəmlənmə qliserin-su qarışığının faizini dəyişməklə aparılmışdır. Zülallarda ultrabənövşəyi (UB) şüaların təsirindən yaranan sərbəst radikalların temperaturdan asılı rekombinasiyası xüsusi maraq kəsb edir. Temperaturdan asılı tam rekombinasiya 120 K÷340 K intervalında baş verir. Su ilə nəmlənən fibroin zülalında 77K-də UB şüanın təsirindən yaranan sərbəst radikalların yanma əyrisində üç keçid nöqtəsi müşahidə olunmuşdur. Bu keçid temperaturlarının ~135 K, 205 K və 279 K oblastında olması aydın müşahidə olunur. Sərbəst radikalların 2-6% artımı ~ 135 K temperaturda baş verir. Birinci keçid qliserin-su qarışığının 40% və 50% olduğu məhlula yerləşdirilmiş fibroin zülalında UB şüaların təsirindən yaranan sərbəst radikalların termik rekombinasiya əyrisində baş verir. İkinci keçid isə həm nəm, həm də quru fibroin nümunəsində ~205 K temperaturda baş verir. Üçüncü keçid quru fibroin nümunələrində daha yüksək temperaturda 363K, nəm nümunələrdə isə nisbətən aşağı temperaturda 279K-də baş verir. 205 K temperaturda keçidlər su molekulları ilə zəif rəbitədə və 279 K-dəki istilik keçidləri güclü əlaqədə olurlar. Keçidlərdə iştirak edən radikalların təbiəti müəyyən edilmişdir.

Açar sözlər: EPR, fibroin, UB şüalar, sərbəst radikallı proseslər, sərbəst radikalların rekombinasiyası.

PACS: 87.64.-t

1. GİRİŞ.

Zülallar metabolizm proseslərində iştirak edir və orqanizmin qurucu materialı olmaqla yanaşı onda müxtəlif funksiyaları yerinə yetirir. Orqanizmin həyati fəaliyyətini saxlamaq üçün zülalların funksiyaları böyük əhəmiyyət daşıyır. Zülalların funksiyasının başa düşülməsində onların quruluşu və dinamikası böyük əhəmiyyət kəsb edir. Zülalların dinamikası əsasən fırtınalı enerji mənzərəsi və rəqslərlə müəyyən olunur [1, 2]. Zülal enerji mənzərəsinin əsas konsepsiyası zülal strukturunun və dinamikasının temperaturdan asılılığının öyrənilməsi ilə tərtib edilmişdir [3]. Zülalın fiziki vəziyyətini, eləcə də dinamikanın öyrənilmə növünü, uyğun temperatur intervalı müəyyənləşdirir. Zülal dinamikasının temperaturdan asılılığı fundamental metodlardan nüvə maqnit rezonansı (NMR), rentgen difraksiyası, neytron səpilməsi, elektron paramaqnit rezonansı (EPR) və flüoressensiya kimi metodlarla tədqiq edilmişdir. Zülalın dinamikasını ölçmək üçün hər bir üsulun öz zaman şkalası vardır.

Təbiətdə zülallara təsir edən faktorlardan biri də UB şüalardır. Bu şüaların təsirindən amin turşularının ionizasiyasından yaranan sərbəst radikalların stabilliyi temperaturdan kəskin asılıdır. Hüceyrələrin normal və patoloji hallarında sərbəst radikallar daim müşahidə olunur. Buna baxmayaraq, zülal dinamikasının öyrənilməsində sərbəst radikallardan “müxbir qrup” kimi istifadə etmək daha az tədqiq edilmişdir. Zülallarda da sərbəst radikalların dinamikası onun quruluşundan və hidratsiya dərəcəsindən asılı olacaq. Sərbəst radikallar, normal şəraitdə hüceyrə metabolizmində əhəmiyyətli rol oynayan son dərəcə reaktiv oksidantlardır və onların konsentrasiyası çox olduqda hüceyrə quruluşu dağıla bilər ki, bu da onların ölmünə səbəb olar [4].

Fibroin məişətdə, təbabətdə, kosmosda və elektrotexnikada geniş istifadə olunan biomaterialdir [5-

11]. Fibroin *Bombyx mori* ipək qurdunun yaratdığı ipəyin əsas zülalıdır. Fibroinin həm də yaxşı bioloji uyğunluq xüsusiyyəti var [12]. Fibroin disulfid bağları ilə kovalent şəkildə birləşmiş iki polipeptid zəncirdən, yüngül Fib-L zənciri 26kDa (262 amin turşuları) və ağır Fib-H ağır 350kDa (5263 amin turşuları) ibarət olan bir heterodimerdir [13-15]. Fibroin zülalı kristal və amorf hissədən ibarət olan semikristal material kimi qəbul edilir ki, bu da onun bir çox xüsusiyyətini müəyyən edir.

Hal-hazırda UB şüanın fibroin zülalına təsirinə öyrənən bir sıra elmi işlər mövcuddur [17-21]. Göstərilmişdir ki, oksigensiz mühitdə sərbəst radikalların EPR spektrləri bənzər olurlar. UB şüaların təsirindən fibroin zülalında yaranan ilkin sərbəst radikalların yaranması ilə yaxşı razılaşma olsa da, sonrakı reaksiyalar nəticəsində yaranan sərbəst radikalların təbiəti birmənalı deyil. Təqdim olunan işdə UB şüaların təsirindən quru və nəmlənmiş fibroin zülalında yaranan sərbəst radikalların rekombinasiyasının müxtəlif temperaturlarda zamandan asılı reaksiyaları öyrənilmişdir. Əvvəllər tədqiq olunmuş işlərdə rekombinasiya kinetikasında, ümumi temperatur tənəzzülü, reaksiyanın keçid nöqtələri və sərbəst radikalların təbiəti nəzərə alınmamışdır. Təqdim etdiyimiz məqalə bu çatışmazlığı aradan qaldırmağa yönəlmişdir.

Təqdim etdiyimiz məqalədə məqsədimiz, zülalların strukturunun və nəmlənmə faizinin sərbəst radikalların rekombinasiyasından asılılığını öyrənməkdir, fibroin nümunələrində sərbəst radikallar maksimum həddə çatana qədər UB şüalarla şüalandırılmışdır. Şüalanma müddəti bir saat olmuşdur, bu müddətdə sərbəst radikalların yaranması 95-100%-ə çatır. UB şüalanmadan sonra termik rekombinasiyadan əvvəl nümunələrdə müşahidə olunan EPR siqnalları eyni intensivliyə malik olmuşdur ki, bu da nümunələrin eyni dozada şüalandığını göstərir. Göstərilmişdir ki, sərbəstradikallı

sönmənin sürəti ilkin konsentrasiyadan xətti asılıdır [22] və buna görə, ilkin konsentrasiyalara normallaşdırılmış sərbəst radikal rekombinasiya reaksiyası, reaksiyanın eyni parametrlərini verir.

2. MATERİALLAR VƏ METODLAR.

2.1. İlkin hazırlıqlar.

Bombyx mori ipək qozalarından fibroin liflərinin alınması qəbul edilmiş metodlarla aparılmışdır, bu zaman ipək qozaları xırda hissələrə kəsilərək 30 dəqiqə ərzində 0,02 M Na₂CO₃ məhlulunda qaynadılmışdır. Yuyulmadan sonra ipək lifləri deionizə olunmuş suda təmiz yuyulmuş və qurudulmuşdur [23]. Nümunələrin nəmlənmə prosesi distillə suyunda və distillə suyunun qliserinlə müxtəlif qarışıqlarında (40% və 50% h/h) 24 saatdan az olmayaraq inkubasiya etməklə aparılmışdır.

2.2. UB şüalanma.

Nümunələrin şüalanması 77K temperaturda yüksək təzyiqli civə lampasından (DRŞ 500) alınan şüalarla aparılmışdır. Nümunələr üzərinə düşən işıq su filtrindən keçməklə kvarts linza ilə fokuslanmışdır. Kvars ampulalara yerləşdirilmiş quru nümunələr orada olan sərbəst oksigeni sıxışdırmaq məqsədi ilə bir müddət arqon qazında yuyulduqdan sonra, ampulanın ağzı qapanır və nümunələr bu mühitdə qalır. Nəmli nümunələrdə həll olmuş qazlar, məhlulları bir neçə dəfə maye azotda dondurub açmaqla vakuum nasosu vasitəsi ilə xaric edilir. Bütün nümunələr maksimum sərbəst radikallar yaranana kimi şüalandırılmışdır. DRŞ 500 lampasının verdiyi UB işıqla fibroin nümunəsinin bir saat ərzində şüalanması orada yaranan sərbəst radikalları maksimum həddə çatdırır. Nümunələrin eyni UB doza alması üçün çalışmışıq ki, termik rekombinasiyaya başlamazdan əvvəl EPR spektrləri eyni intensivliyə malik olsun. Əvvəllər göstərilmişdir ki, sərbəst radikalların rekombinasiya sürəti sərbəst radikalların ilkin konsentrasiyasından xətti asılıdır. 77K temperaturda UB şüanın təsirindən yaranan sərbəst radikalların konsentrasiyasına normallaşdırılmış radikalların reaksiyası reaksiyanın eyni parametrlərini verəcək.

2.3. EPR spektroskopiyası.

77K temperaturda fibroin zülalında UB şüanın təsirindən yaranan sərbəst radikalların EPR spektrləri Bruker firmasının "ELEXSYS E580" spektrometrində X diapazon tezliyində dəyişən temperatur aksesuarlarında qeyd edilmişdir. Nümunələr seçilmiş temperaturlarda 15 dəqiqə saxlanıldıqdan sonra ani olaraq içərisində maye azot olan düarə köçürülür. 77K temperaturda temperaturdan asılı olan sərbəst radikalların rekombinasiyası dayanır. Hər temperatura uyğun eksperimentlər bir neçə dəfə təkrarlanır. EPR ölçmələri apararkən korreksiyanı aradan qaldırmaq üçün bütün spektrlər 77K-də qeydə alınır ki, bu da sərbəst radikalların konsentrasiyasının hesablanmasında temperatur dəyişkənliyini nəzərə alır. Temperaturdan asılı radikalların rekombinasiyasını kəmiyyət etibarlı ilə müqayisə etmək üçün hər temperatura uyğun EPR spektrlərinin ikiqat inteqrallanması aparılmışdır. EPR spektrlərinin

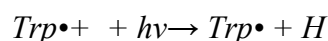
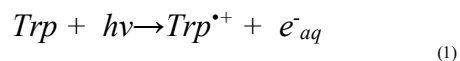
çəkilişi zamanı maqnit sahəsinin dəyişmə intervalı 200G, İYT gücü 0,47mVt və modulyasiya amplitudu 2G seçilmişdir. Bruker firmasının cihazla birgə təqdim etdiyi proqram təminatı əsasında ifrat incə parçalanma sabiti və g-faktor müəyyən edilmişdir. EPR ölçmələrindən alınan spektrlərin ikiqat inteqrallanmasını OriginLab (OriginLab Corp., Northampton, MA) proqramı vasitəsi ilə həyata keçirilmişdir. Spektrlərin baza xətlərinin seçilməsində olan səhvləri minimuma endirmək üçün ikiqat inteqrallama iki mərhələdə aparılmışdır. Spektrin birinci törəməsinin inteqrallanmasını yerinə yetirdikdən sonra, düzgün udulma zolağını almaq üçün, yeni baza xətti yaradılmışdır. İkinci inteqrallanmanı baza xətti korreksiya olunmuş spektri istifadə etməklə aparılmışdır.

3. NƏTİCƏLƏR VƏ MÜZAKİRƏLƏR.

3.1 UB şüaların təsirindən ipək fibroinində yaranan sərbəst radikalların EPR spektrləri.

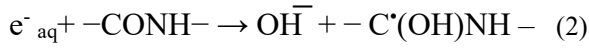
Şəkil 1-də quru və nəmlənmiş fibroin zülalında UB şüalanmadan sonra yaranan sərbəst radikalların seçilmiş temperaturda qızdırıldıqdan sonra qalan radikalların EPR spektrləri göstərilmişdir. Alınan dublet EPR spektrlərinin g-faktoru 2,004 və uyğun ifrat incələnmə sabiti ~16 G olmuşdur. UB şüalanmadan yaranan radikalların təbiətinə nəmlənmənin təsiri yoxdur. Yaranan radikallar isə zülallarda əsasən aromatik amin turşularının ionlaşması hesabına olur. Yaranan radikallardan ən çox pay Trp. və Tir.-nə düşür [24]. UB şüanın təsirindən əsasən Tir. ionlaşır. Fibroində isə əsas etibarlı ilə Tir. ionlaşır. İpək fibroinin 275 nm-də həyəcanlanması, maksimumu 305 nm olan Tir. qalıqlarına xas olan [20] flüoressent şüalanma əmələ gətirir. İpək fibroinində Trp. qalıqları az olduğundan həyəcanlanmanın bu dalğa uzunluğunda Trp.-dan flüoressent şüalanma görsənmir. Fibroinin 280 nm həyəcanlanmasından flüoressent şüalanma zülalın ikinci quruluşundan asılıdır [25].

Lakin fibroinin lüminesent şüalanması ancaq Tir.-lə və ya Trp.-la əlaqədardır. Ona görə də, ipək fibroininin UB şüalanması Tir. və ya Trp. həyəcanlanma halına gətirir. Aromatik amin turşularının həyəcanlanmış halı radiasiyalı relaksasiya (flüoressent şüalanma) və ya qeyri-şüalanma relaksasiyası yaşada bilər ki, bunlardan biri də ionlaşmadır. Trp. ionlaşması qeyri relaksasiyalı preflüoressent S* və zəifləmiş flüoressent hal S₁-dən [26] baş verə bilər. Məhlullarda aromatik məhlullardan ayrılan elektronlar solvativləşmiş elektronlar verir e_{aq}⁻. Aromatik qalıqların kation radikalları tez köçürülür və uyğun neytral radikallar yaradır.



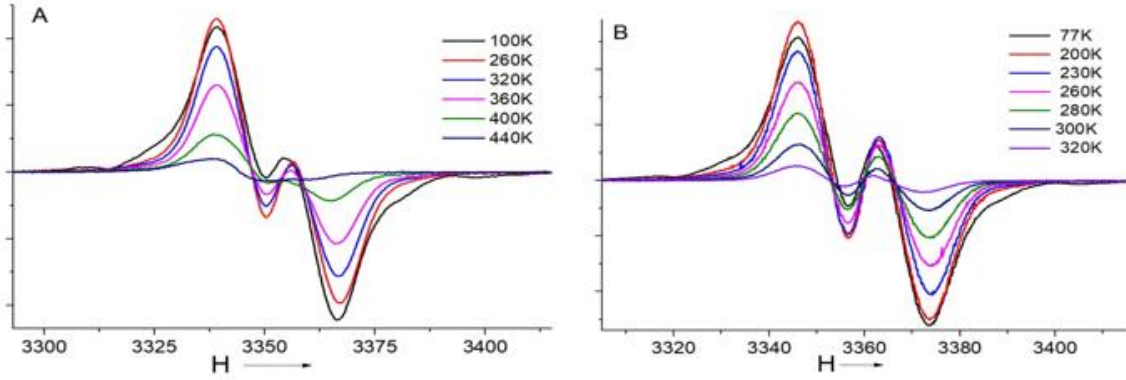
Tir. qalığının fotoionizasiyadan son məhsulu Trp. qalığının son məhsulu ilə, neytral Tir – O' radikallar və solvativləşmiş elektronlar e_{aq}⁻ eynidir. İlkin yaranan sərbəst radikallar ilə aromatik qalıqların müxtəlif reaksiyaları yarana bilər. İpək fibroin üçün vacib olan peptid zəncirində lokallaşmış sərbəst radikallardır. Karbon atomlarının peptid zəncirinin karbonil qrupları karbon

radikalları kimi məşhur olan ketil radikalların yaranması ilə, solvativləşmiş elektronları tuta bilər [24].

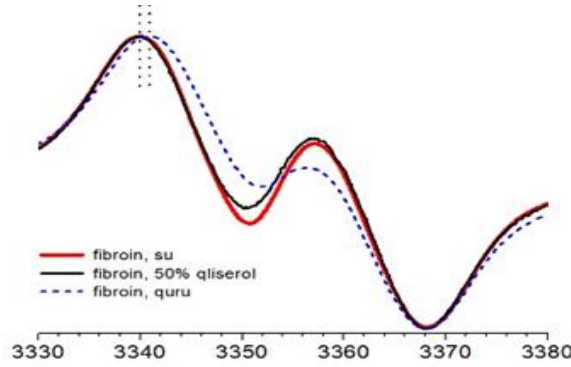


Karbonil radikallar peptid zənciri boyunca yayıla bilər və uyğunsuzluq (disproporsional) reaksiyalarda və rekombinasiyalarda iştirak edə bilər. Quru zülallarda

aromatik qalıqlardan ayrılmış elektronlar, elektronların solvativləşmiş halından yan keçərək, karbonil qrupunun karbon atomları tərəfindən birbaşa tutula bilər. Ona görə də UB şüalanma ilə induksiya edilən sərbəst radikalların təbiəti və uyğun EPR spektrləri, gözlənilməli kimi, fibroinin quru və nəmlənmiş formasında bənzərliyi çox olacaqdır (şəkil 1).



Şəkil 1. Ayrı-ayrı temperaturlarda ipək fibroinində UB şüalanma nəticəsində yaranmış sərbəst radikalların qızdırılmadan sonra EPR spektrləri. (a) quru və (b) 50%-li qliserin məhlulunda nəmləndirilmiş fibroin. EPR spektrlərinin qeydiyyatı 77K-də aparılmışdır. Spektrlərin aydın görsənməsi üçün tədqiq olunan bütün temperaturlara aid olan EPR spektrləri göstərilmişdir.



Şəkil 2. UB şüalanma nəticəsində quru və 50% qliserin məhluluna yerləşdirilmiş ipək fibroinində yaranan sərbəst radikalların EPR spektrləri. Aydınlıq üçün spektrlərin hər iki qanadı kəsilmişdir.

Quru və nəmlənmiş formada olan fibroinin elektronlarının spinlərinin karbon atomu və yaxın protonlarla qarşılıqlı təsirdən yaranan sərbəst radikallarının EPR spektrlərində dublet xətlər üstünlük təşkil edir. Fibroin zülalında yaranan sərbəst radikalların EPR spektrlərini müqayisə etdikdə görünür ki, quru formalarda dublet xətlərin icazəliyi nəmlənmiş forma ilə müqayisədə pisdir və onların ifrat incə parçalanma sabitində fərq kiçikdir.

Quru fibroinin dublet EPR spektrinin ifrat incə parçalanma sabiti (16,2 G) nəmlənmiş fibroin nümunələrində təxminən 1G artmışdır. Suyu və 50% qliserin məhluluna salınmış fibroin üçün ifrat incə parçalanma sabiti eynidir. Məlumatlar göstərir ki, dublet spektrlərə məsul olan sərbəst radikallar, solvatlanmış olur.

Quru formada olan fibroində sinqlet EPR spektrləri daha yüksək temperaturlarda əmələ gəlir (şəkil 1a), nəmlənmiş formada isə özünü göstərmir (şəkil 1b). Nəmlənmiş formada əsas zəncirin dinamikası yüksəkdir, ancaq α -karbon sərbəst radikalların rekombinasiyası nisbətən aşağı temperaturlarda daha tam olur. Sinqlet

EPR xətti, kömürləşmə prosesinin başlanğıcının 440K temperatura təsadüf etdiyini göstərir. Fibroinin müxtəlif formalarında temperaturdan asılı sərbəst radikalların rekombinasiyası, zülalların dinamikasında yaranan xüsusyyətləri aydınlaşdırmalıdır.

Qeyd etmək lazımdır ki, fibroinin elektron-şüa ilə şüalanması da uyğun dublet EPR spektrinin yaranmasına gətirir [27, 28]. Aydın ki, aromatik qalıqdan ayrılan, paketdən olan hər iki elektronlar, eyni bir qrup, karbonil qrupunun karbon atomu tərəfindən tutulur, ancaq bu radikalların temperaturdan asılı sönməsi tədqiq edilməmişdir.

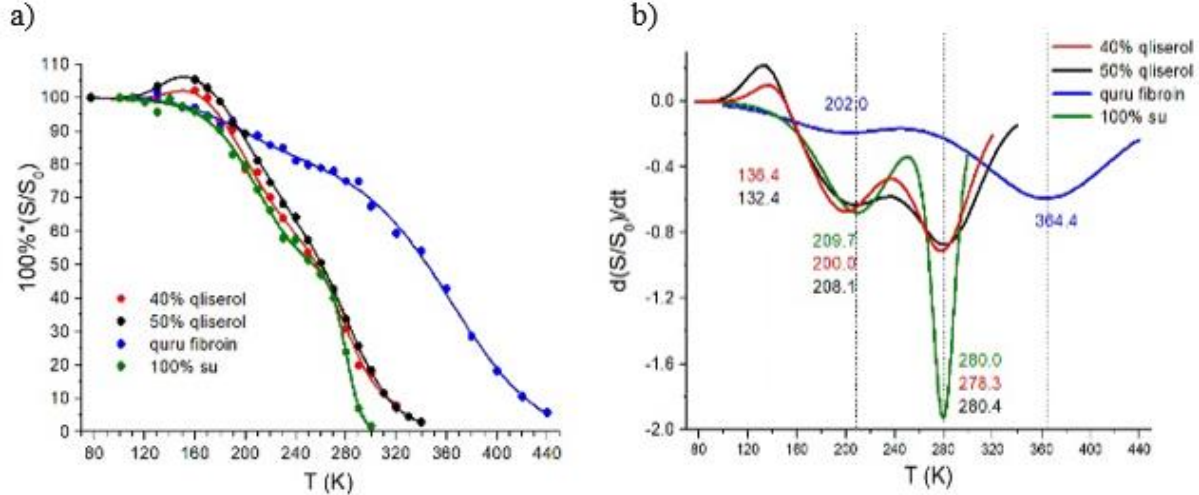
3.2. İpək fibroinində ultrabənövşəyi şüalanma ilə induksiya edilmiş sərbəst radikalların termik rekombinasiyası.

Şəkil 3a-da müxtəlif dərəcədə nəmlənmə və quru halında olan ipək fibroinində sərbəst radikalların termik rekombinasiya əyrisi göstərilmişdir. 40% və 50% qliserin məhluluna yüklənmiş fibroin nümunələrində

114K-151K temperatur intervalında spinlərin ümumi sayının artması görsənir. Bu nümunələri 77K-də dondurduqda fibroin ətrafında şəffaf şüşə yaradır. Temperaturu artırırdıqda (114 K-151 K) sərbəst radikalların çoxalmasını “qəfəs effekti” ilə izah etmək olar. Fibroini UB şüalandırdıqda yaranan bir neçə cüt sərbəst radikallar (həmişə cütlər tərəfindən yaranan sərbəst radikallar) “qəfəsə” düşür. Qəfəsdə cütləşən sərbəst radikalların bir-birinə yaxın olmasına görə spin-spin qarşılıqlı tə-

sirindən spektral xətlər çox geniş olur. Ona görə də, qəfəsdə tutulan radikal cütləri EPR spektrlərində görsənir.

Çox güman ki, termik aktivləşmə zamanı qəfəs tərəfindən tutulmuş radikallar yox olur ki, bu da EPR spektrlərinin yaranmasına səbəb olur (şəkil 1 və 3). Təmiz suda kristal buz formalaşması, sərbəst radikal cütləri sabitləşdirə bilən hüceyrələrin meydana gəlməsinə mane olur.



Şəkil 3. a) müxtəlif sulu və quru hallarda UB şüalanmadan sonra ipək fibroinində yaranan sərbəst radikalların termik rekombinasiyası və onların birinci tərtib törəmələrinin müvafiq əyriləri; b) Törəmə əyriləri məlumat nöqtələrini birləşdirən hamar xətlərdən istifadə etməklə alınmışdır.

Cədvəl 1.

Fibroinin müxtəlif hallarında sərbəst radikalların istilikdən sönmə əyrisinin parametrləri.

Nümunə	Td1 (K)*	Td2 (K)	Td3 (K)
Quru fibroin		202.2	363.6
Fibroin təmiz suda		209.4	279.5
Fibroin 40% -li qliserində	136.7	200.4	277.6
Fibroin 50% -li qliserində	132.5	208.3	281.0
Orta qiymət		205.1 ± 4.4	279.4 ± 1.7**
*Aktivləşmiş dinamikanın keçid temperaturu; **quru fibroinin qiyməti istisna olmaqla			

Spinlərin ümumi sayının ilkin artımına əlavə olaraq, bütün sərbəst radikalların rekombinasiya əyriləri təxminən 77K-250K və 250K-450K temperatur intervallarına (şəkil 3a) bölünə bilən iki fərqli bölgəni göstərir. Rekombinasiya əyrilərinin birinci tərtib törəmələri keçid temperaturlarını, rekombinasiya sürətinin maksimumunu müəyyən etmək üçün istifadə olunur (şəkil 3 b, cədvəl 1). Maraqlıdır ki, keçid temperaturu bütün nümunələr üçün 205,1±4,4 K (hamısı üçün ortalama) təxminən eynidir. Zülalın nəmlənməsi keçid temperaturunu əhəmiyyətli dərəcədə dəyişmir. Lakin, quru fibroində, ~205 K keçid temperaturundan məsul olan sərbəst radikalların rekombinasiyası daha geniş temperatur intervalında baş verir (şəkil 3). Bu, quru fibroindəki sərbəst radikalların daha heterogen mühitə malik olduğunu göstərir və bu aktivasiya enerjilərinin daha geniş yayılmasına gətirib çıxarır. Bundan əlavə, birinci bölgədəki sərbəst radikalların rekombinasiya amplitudu nəmlənmiş nümunələrin amplitudu ilə müqayisədə

daha azdır. Su və su ilə gliserin qarışığına batırılmış fibroin nümunələrində sərbəst radikal rekombinasiyalar eyni keçid temperaturunu 279.4 K göstərir (şəkil 3, cədvəl 1). Lakin, suda olan fibroin, gliserin qarışıqları ilə nəmlənmiş fibroinlə müqayisədə 279.4 K səviyyəsində daha sət bir temperatur keçidini göstərir.

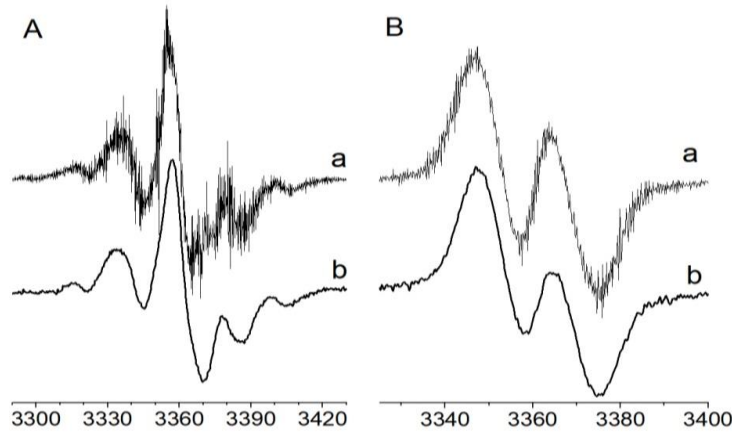
Beləliklə, təmiz su ilə nəmlənmiş fibroinin sərbəst radikalları daha çox homogen bir mühitə malikdir və bu, aktivləşmə enerjilərinin daha dar yayılmasını göstərir. Quru fibroində isə ~279.4 K temperaturda keçid müşahidə olunmur. Əvəzində isə 84 K daha yüksək temperatura tərəf sürüşməklə, ikinci keçid təxminən 363,6 K temperaturda baş verir. Alınan nəticələr göstərir ki, zülal dinamikası sərbəst radikalların dağılması üçün məsuliyyət daşıyır və 279.4 K keçid nöqtəsi su ilə sıx bağlıdır.

Sərbəst radikalların təbiətinin birinci və ikinci bölgələrdə uyğunluğu barədə sual yaranır. Fibroinin quru və nəmlənmiş formalarında sərbəst radikalların

EPR spektrlərindəki fərq hər iki bölgədə sərbəst radikalın təbiətini müəyyən etmək üçün, rekombinasiyanın keçid temperaturu alınmışdır (şəkil 4). Birinci bölgədə spektrlərin müxtəlifliyi informativdir (şəkil 4a).

Həm quru və həm də nəmlənmiş nümunələrdə, kvintetlərin spektrləri təxminən 1: 6: 20: 6: 1 nisbətində aydın görünür. Məlumatlar quru və nəmlənmiş fibroin nümunələri üçün rekombinasiyaya məruz qalmış radikalın təbiətinin eyni olduğunu göstərir. Spektrləri fibroində ən çox yayılmış zəncirin sonunda Gly və Ala qalıqlarında olan radikallara aid etmək olar. Termal radikalın Gly (-CONH-ĈH₂) и Ala (-CONH- ĈH (CH₃)) EPR spektrlərinin amplitudlarının nisbəti uyğun olaraq 1: 2: 1 və 1: 4: 6: 4: 1 kimi görünür. Zəncir,

sonluğunda Gly, Ala və başqa aminturşular radikallarının qeyri-mütənasib töhfəsinə fərq spektrlərinin müşahidə olunan amplitud nisbətləri məsuldur. İstənilən halda, Gly və Ala-nın üstünlükləri (dominantlığı) aşkardır. Beləliklə, fibroini UB şüa ilə şüalandırdıqda α -karbon radikalı ilə birlikdə zəncir sonluğunda məskunlaşan aminturşuların da sərbəst radikalı müəyyən oluna bilər. Zəncir sonluğundakı radikallar daha çox yüyrüklük göstərir, ancaq su molekulları ilə zəif rəhbərlik olurlar. Suda həcmi həlledici, qliserin məhlulları da həmçinin 205K-də donurlar. Dondurulmuş həcmli həlledicilər, zəncir qrupların və nəmlənmə qabığı ilə əhatə olunan lokal dinamikanı (kiçik amplitudları) məhdudlaşdırır.



Şəkil 4: Su ilə zəif (77-250 K) və güclü əlaqə bölgəsində (250-450K) fibroinin ultrabənövşəyi şüa ilə şüalandırılmış sərbəst radikalının fərqli EPR spektrləri. a) A: su (77 K - 220 K) və B: quru (77 K - 250 K) formalar. b) A: fibroin suda (280 K-290 K) və B: quru fibroin (380 K-400 K).

İkinci temperatur keçid bölgəsində, quru və nəm hallarında fibroində sərbəst radikalın fərqlilik spektrləri (şəkil 4 b) göstərir ki, sərbəst radikalın növləri ilk keçid bölgəsində olan növlərdən fərqlənir. Hər iki halda, yaxşı icazəli dublet spektrlər aşkardır. Yuxarıda qeyd edildiyi kimi, bu spektrlər -Ĉ (OH)-NH-karbon radikalına aid edilə bilər. Şəkil 2-yə uyğun olaraq, fərq spektrlərində, nəmləndirilmiş nümunədə dubletin parçalanması quru nümunəyə nisbətən təxminən 1 G çoxdur. İkinci keçid temperaturunda (279 K) maye həcm həlledicisi əsas protein zəncirinin nisbətən böyük miqyaslı hərəkəti üçün imkan verir ki, bu da həlledici molekulların mütərəqqi hərəkətini tələb edir. Gözlənilməli kimi, bu hərəkət su ilə sıx bağlıdır.

4. NƏTİCƏLƏR

Quru və nəmlilik dərəcəsi müxtəlif formalarda olan ipək fibroinin ultrabənövşəyi şüalanmasından yaranan sərbəst radikalın termal parçalanması zülalın müxtəlif dinamik rejimlərini aşkar etdi. Zülalın hər dinamik rejimi keçid temperaturu ilə xarakterizə olunur. 40% və 50% qliserin məhlulunda nəmlənən fibroin üçün müşahidə edilən ~135K ən aşağı keçid temperaturu, "qəfəsdən" cüt sərbəst radikalın rekombinasiyasını xarakterizə edir. Keçid temperaturu ~205 K quru fibroin də daxil olmaqla bütün nümunələrə aiddir. Zülalın nəmlənməsi sabit keçid temperaturunu saxlamaqla

keçid ölçüsünü (dəyərini) əhəmiyyətli dərəcədə dəyişir. Buna görə, dinamik rejim ~ 205K keçid temperaturuna uyğun olan zülal su ilə zəif əlaqəli hesab olunur. Keçid temperaturu ~279 K nəmlənmiş nümunələrdə müşahidə olunmuşdur, quru zülalda isə bu temperaturda keçid müşahidə edilməmişdir. Təmiz suya salınmış fibroində ən kəskin keçid müşahidə olunur. Nəticələr göstərir ki, zülalların ~279 K keçid temperaturu ilə xarakterizə olunan dinamik rejimi su ilə sıx əlaqədədir. Quru fibroində, bu dinamik rejimin keçid temperaturu ~364K-də müşahidə olunur və əhəmiyyətli dərəcədə yüksək temperaturla doğru dəyişir. Beləliklə, fibroinin ultrabənövşəyi şüalanmasından yaranan sərbəst radikalın termal parçalanması zülalın su ilə bağlı dinamik rejimlərini fərqləndirir. İki müxtəlif rejimdə iştirak edən sərbəst radikalın təbiəti fərqlidir. Lakin, temperatur keçid nöqtələrində ən çox ehtimal olunan fərq, ilk növbədə radikal təbiətinin mahiyyətinə, zəncirin uc dinamikasına və zəncirin orta əlaqələrinə bağlıdır. Bu təklifi əsaslandırmaq üçün gələcək tədqiqatlara ehtiyac var.

Müəlliflər Bruker ELEXSYS E580 spektrometriyə çıxışı təmin etdikləri üçün AMEA Fizika İnstitutunun İnnovasiya Sektoruna təşəkkür edir və bu tədqiqatların aparılması üçün maddi dəstəyə görə Azərbaycan Milli Elmlər Akademiyasına minnətdarlıqlarını bildirirlər.

- [1] L. Meinhold, J.C. Smith, A. Kitao and A.H. Zewail. "Picosecond actuating protein energy landscape mapped by pressure temperature molecular dynamics simulation," Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, vol. 104, no. 44, pp. 17261-17265.
- [2] H. Frauenfelder. *Physical Biology*, 2017, vol. 14, no. 1, p. 010402.
- [3] H. Frauenfelder, R. D. Young, and P. W. Fenimore. *J. Phys. Chem. B*, 2013, vol. 117, no. 42, pp. 13301-13307.
- [4] O. I. Aruoma. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, vol. 75, no. 2, pp. 199-212.
- [5] Q. Dong, H. Su, and D. Zhang. *Journal of Physical Chemistry B*, 2005, vol. 109, no. 37, pp. 17429-17434.
- [6] B.D.Lawrence, J.K.Marchant, M.A.Pindrus, F.G. Omenetto and D. L. Kaplan. *Biomaterials*, 2009, vol. 30, no. 7, pp. 1299-1308, 2009.
- [7] G. Yin, Z. Huang, M. Deng, J. Zeng, and J. Gu. 2011, *Journal of Coll.Interf. Sci.*, vol.363, no. 1, pp. 393-402.
- [8] X.X.Feng, L.L.Zhang, J.Y. Chen, Y.H. Guo, H.P. Zhang, and C.I. Jia. *International J. Biological Macromolecules*, 2007, vol. 40, no. 2, pp. 105-111.
- [9] Y. Tamada. *Biomaterials*, 2004, vol. 25, no. 3, pp. 377-383.
- [10] X. Wang, J.A. Kluge, G.G. Leisk and D.L.Kaplan. *Biomaterials*, 2008, vol. 29, no. 8, pp. 1054-1064.
- [11] E. Wenk, A. J. Wandrey, H. P. Merkle, and L. Meinel. *J. Controlled Release*, 2008, vol.132, no. 1, pp. 26-34.
- [12] A. Matsumoto, J. Chen, A. L. Collette et al.. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 43, pp. 21630-21638, 2006.
- [13] C.Z. Zhou. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 12, pp. 2413-2419.
- [14] О.И. Агапова, И.И. Аганов. Биодegradуемые изделия на основе фиброина шелка для тканевой инженерии и регенеративной медицины.
- [15] Yang Cao and Bochu Wang. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10, 1514-1524.
- [16] T. Lefevre, M.E. Rousseau and M.Prezolet. *Biophysical Journal*, 2007, vol. 92, no. 8, pp. 2885-2895.
- [17] J. Shao, C. M. Carr, C. P. Rowlands and J. Walton. *Journal of the Textile Institute*, 1999, vol. 90, no. 4, pp. 459-468.
- [18] S. V. Mamedov, B. Akta, M. Cantürk et al.. *Biomaterials*, 2002, vol. 23, no. 16, pp.3405-3412.
- [19] R. Liu, L. Xie and K. Sheng. *Nuclear Science and Techniques*, 2007, vol. 18, no. 5, pp. 268-271.
- [20] A. Sionkowska and A. Planecka. *Polymer Degradation and Stability*, 2011, vol. 96, no. 4, pp. 523-528.
- [21] K. Setoyama. *Journal of Sericultural Science of Japan*, 1982 vol. 51, no. 4, pp. 271-278.
- [22] K.M. Lvov and Y.A. Kim. 1975, *Biopolymers*, vol. 14, no. 1, pp. 83-91.
- [23] Danielle N Rockwood, Rucsanda C Preda, Tuna Yücel, Xiaoqin Wang, Michael L Lovett & David L Kaplan. *Nature protocols*, 2011, vol. 6, No.10.
- [24] M.T.Neves-Petersen, S.Klitgaard, T.Pascher et al.. *Biophysical Journal*, 2009, vol. 97, no. 1, pp. 211-226.
- [25] B. P. Partlow, M. Bagheri, J. L. Harden, and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2016, vol. 17, no. 11, pp. 3570-3579.
- [26] P.S. Sherin, O.A. Snytnikova, and Y.P. Tsentlovich. *Chemical Physics Letters*, 2004, vol. 391, no. 1-3, pp. 44-49.
- [27] J. Liu, J. Shao, and J. Zheng. *Journal of Applied Polymer Science*, 2004, vol. 91, no. 3, pp. 2028-2034.
- [28] W.Li, X. Qiao, K. Sun and X. Chen. *Journal of Applied Polymer Science*, 2009, vol. 113, no. 2, pp. 1063-1069.

Rasim B. Aslanov, Laman M.Suleymanova

THE INVESTIGATION OF PROTEIN DYNAMICS IN SILK FIBROIN BY THE WAY OF RECOMBINATION OF FREE RADICALS UNDER THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLET BEAMS

The interrelation between structure, dynamics and biomolecule functions is the one of fundamental interest of biophysics. The protein dynamics significantly changes in time and space. The hydration influence on fibroin protein dynamics obtained from cocoon silk is investigated in present article. The hydration is carried out by the change of percentage of glycerine-water mixture. The temperature-dependent recombination of free radicals in proteins caused by ultraviolet radiation (*UV*) is of the special interest. The total recombination takes place in range 120-340K in the dependence on hydration level. The three points of the transition on burning curve of free radicals generated by ultraviolet radiation at 77K, are observed in hydrated fibroin protein. It is seen that transition temperatures are ~135 K, 205 K and 279 K. The increase of free radical quantity on 2-6% takes place at temperature ~135K. The first transition in recombination of free radicals caused by ultraviolet beams takes place when mixture of glycerine and water is 40% and 50%. The second transition is observed in both wet and dry samples of fibroin at temperature ~205K. The third transition takes place at 363K at higher temperatures in fibroin dry samples and at 279K at relatively low temperatures in wet samples. At 205K the transitions with water molecules are weak ones and at 279K the transitions are strong ones. The radical nature taking part in transitions is established.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ БЕЛКОВ В ФИБРОИНЕ ШЕЛКА ПУТЕМ РЕКОМБИНАЦИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ

Одним из фундаментальных интересов биофизики является взаимосвязь между структурой, динамикой и функциями биомолекул. Динамика белков значительно меняется во времени и пространстве. В представленной статье изучалось влияние гидратации на динамику белка фиброина, полученного из коконного шелка. Гидратация осуществлялась изменением процентного содержания смеси глицерин-вода. Особый интерес представляет температурно-зависимая рекомбинация свободных радикалов в белках, вызванная ультрафиолетовым (УФ) излучением. В зависимости от уровня гидратации полная рекомбинация происходит в диапазоне 120 К - 340 К. В увлажненном водой белке фиброина наблюдались три точки перехода на кривой горения свободных радикалов, генерируемых УФ-излучением при 77 К. Отчетливо видно, что температуры перехода лежат в диапазоне ~ 135 К, 205 К и 279 К. Увеличение количества свободных радикалов на 2-6% происходит при температуре ~ 135 К. Первый переход в рекомбинации свободных радикалов, вызванный УФ-лучами, происходит только тогда, когда смесь глицерина и воды составляет 40% и 50%. Вторым переходом наблюдается как в мокром, так и в сухом образцах фиброина при температуре ~ 205 К. Третий переход происходит при 363 К при более высоких температурах в сухих образцах фиброина и при 279 К при относительно низких температурах во влажных образцах. При 205 К переходы с молекулами воды слабые, а при 279 К переходы сильные. Установлена природа радикалов, участвующих в переходах.

Qəbul olunma tarixi: 25.09.2020