

**RADİOEKOLOJİ AMİLLƏRİN FOTOSİSTEM 2 FRAQMENTLƏRİNDƏ  
PARAMAQNİT MƏRKƏZLƏRƏ TƏSİRİ**

**R.İ.XƏLİLOV<sup>1</sup>, A.N.NƏSİBOVA<sup>2</sup>**

*Bakı Dövlət Universiteti<sup>1</sup>*

*AMEA Radiasiya Problemləri İnstitutu<sup>2</sup>*

*Məqalədə fotosistem 2 (FS 2) subxloroplast hissəciklərində radioekoloji amillərin (ultrabənövşəyi və ionlaşdırıcı radiasiya) paramaqnit mərkəzlərə təsiri EPR üsulu ilə tədqiq olunmuşdur. Müəyyən olunmuşdur ki, bu amillər EPR 2 signalına aşağı dozalarda ciddi təsir göstərmir. Başqa sözlə həmin signalın mənbəyi olan tirazin radikalı kəskin dəyişikliyə uğramır. Kremniyomolibdatın (KM) əlavə olunması ilə işıqda FS 2 hissəciklərində P680<sup>+</sup>-dən alınan EPR 1' signalı müşahidə olunur. Bu zaman Mn<sup>2+</sup> ionlarının signalının böyüməsi, EPR2 signalının kiçilməsi müşahidə olunmuşdur.*

Son illər ərzində ekoloji UB və ionlaşdırıcı şüaların fotosintezə təsiri haqqında bir sıra işlər dərc olunmuşdur [4,6,7]. Aparılan tədqiqatlar əsasən fotosintezin ilkin proseslərinə aiddir. Ayrılmış xloroplastlarda və intakt yarpaqlarda müəyyən olunmuşdur ki, ionlaşdırıcı və UB radiasiya, xüsusilə FS 2-nin quruluş-funksional vəziyyətinə mənfəət təsir göstərir. Bu onunla əlaqədardır ki, tilakoid membranlarında yerləşən FS 2 makrokompleksi təkamül prosesində sonradan yaranmış quruluş olaraq molekulyar oksigenin bilavasitə yaranmasında iştirak edir [3]. Bir çox tədqiqat işlərində göstərilmişdir ki, FS 2 makrokompleksi bir çox stress amillərə həssasdır [4,6]. EPR üsulu ilə aparılmış təcrübələrdə müəyyən olunmuşdur ki, otaq temperaturunda həm *in vivo*, həm də *in vitro* tədqiqatlarında iki cür EPR signalı müşahidə olunur [1,2]. Qaranlıq signalı adlanan EPR 2 signalı FS 2-də yerləşən tirazin radikalına aiddir. EPR 1 signalı isə FS 1 makrokompleksinin reaksiya mərkəzinə aid olub işıqda generasiya olunur [1,3,7].

Qeyd etmək lazımdır ki, FS 2 subxloroplast hissəcikləri EPR 2 signalını müşahidə etmək üçün ən əlverişli obyektidir. Təqdim olunan işdə biz yüksək biokimyəvi fəallığa malik olan FS 2 fraqmentlərində radioekoloji amillərin təsir mexanizmini aydınlaşdırmaq üçün FS 2 makrokompleksinə məxsus paramaqnit mərkəzləri EPR üsulu ilə öyrənmişik.

**Material və metodika**

FS 2 xloroplast fraqmentlərinin ayrılması [5]-ə uyğun olaraq aparılmışdır. Xloroplastlar 0,07 M fosfat buferi (pH 7,0), 0,5 M şəkər və 0,035 M NaCl-dan ibarət olan mühitdə suspenziyaya keçirilmişdir. Sonra sistemə 1%-li digitonin məhlulu əlavə olunmuşdur və ultrasəs UZDP-1 (22 kQs, 400 Vt, 1 dəq.) disperqatorunda işlənmişdir. Alınan suspenziyaya xlorlu natriy (2%-ə qədər) əlavə olunmuşdur və buzda 40 dəq.

ərzində enerjili qarışdırma ilə inkubasiya olunmuşdur. Homogenat 15 dəq. 4000 g ilə sentrifüqadan keçirilmişdir, çöküntü atılmış, supernatanta son 0,1-0,15% qatılığına qədər sürətlə Triton X-100 əlavə olunmuşdur və yenidən 20000 g ilə 45 dəq. ərzində sentrifüqadan keçirilmişdir. Alınan çöküntü, yəni DT-20 fraqmentləri və ya hissəcikləri yığılaraq 0,015 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,035 M NaCl və 0,002 M MgCl<sub>2</sub> tərkibli mühitdə yenidən suspenziyaya keçirilmişdir.

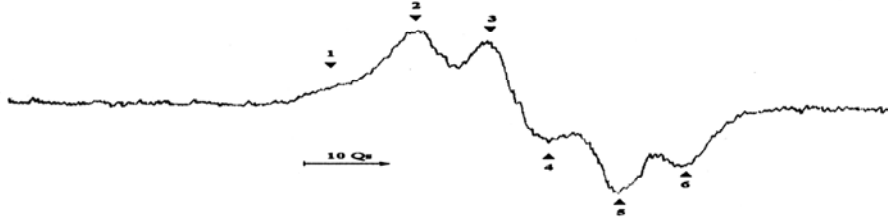
EPR spektrləri 3-sm diapazonlu «Varian E-4» (ABŞ) spektrometrlərində otaq temperaturunda qeyd olunublar. Təcrübələrin bəziləri RE 1306 spektrometridə aparılıb. Tədqiq olunan nümunələrin EPR spektrlərini qeyd etmək üçün onları cihazın rezonatoruna yerləşdirmişik. Kinetik ölçmələr üçün maqnit sahəsi EPR 2 signalının törəməsinin aşağı sahəli pikində fiksə olunub. EPR 2 signalının dəyişikliklərini özüyazan cihazın və yaxud kompüterin köməyi ilə qeyd etmişik. EPR 2 signalının qiymətinin tez dəyişikliklərini qeyd etmək üçün gücləndirici qurğulardan istifadə etmişik.

UB ilə nümunələrin şüalanması DRT – 230 lampası vasitəsilə UFS – 2 filtrindən istifadə etməklə aparılmışdır. Şüalanmanın intensivliyi 20 Vt/m<sup>2</sup> olmuşdur.  $\gamma$ -şüalanma mənbəyi kimi <sup>57</sup>Co izotopundan istifadə edilmişdir. Şüalanmanın gücü 670 Qr/saat olmuşdur.

### Nəticələr və onların müzakirəsi

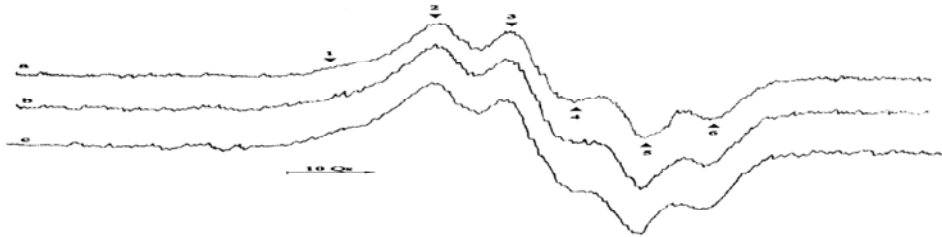
Şəkil 1-də FS 2 fraqmentlərində qaranlıqda EPR 2 signalının spektri verilmişdir. Şəkildən görüldüyü kimi həmin signal yüksək incə quruluşa malik olub, 6 komponentdən ibarətdir. Həmin signalın parametrləri otaq temperaturunda  $g=2,0049$ ,  $\Delta H_{\max}=20$  Qs olmuşdur. FS 2 fraqmentlərində paramaqnit mərkəzlərin xassələrini tədqiq edərkən apardığımız təcrübələrdə biz həmin signalın ifrat yüksək tezlikli sahənin gücünün səviyyəsindən asılılığını öyrənmişik. Həmin signalın radiospektrometrik parametrlərini öyrənərkən ilk növbədə klistronun gələn yüksək tezlikli elektromaqnit dalğalarının gücündən asılılığını nəzərdən keçirmişik. Məlum olmuşdur ki, artıq 20 mVt gücündə signalın doyması müşahidə olunur.  $\Delta H=2000$  Qs olduqda EPR vasitəsilə fraqmentlərin tədqiqi onu göstərir ki, EPR 2 signalından başqa otaq temperaturunda heç bir signal müşahidə olunmur. Müxtəlif spektral tərkibli (707 nm, 650 nm) işıq EPR 2 signalına heç bir təsir göstərmir. Yalnız yüksək intensivlikli ağ işıq həmin signalın amplitudunu böyüdür. FS 2 fraqmentlərində otaq temperaturunda reaksiya mərkəzi P680<sup>+</sup> -dən signal müşahidə etmək üçün çox güclü oksidləşdirici olan kremniyomolibdatdan (KM) (silikomolibdat) istifadə edilmişdir. Bizim təcrübələrdə az miqdarda KM (10<sup>-4</sup> M) əlavə olunması EPR 2 signalının amplitudunu müəyyən qədər azaldır. Paralel olaraq  $\Delta H=2000$  Qs intervalında Mn<sup>2+</sup> ionlarının 6 komponentli signalının əmələ gəlməsini müşahidə edirik. Ekspozisiya (saxlanma) müddətindən asılı olaraq 6 komponentli signalın böyüməsi, EPR 2 signalının isə kiçilməsi müşahidə olunur. Ola bilsin ki, KM FS 2-nin donor hissəsində tirazin molekulunun oksidləşmə-reduksiya potensialını dəyişir, suyu parçalayan fermentativ sistemdə destruksiya prosesini həyata keçirərək Mn<sup>2+</sup> ionlarının oradan qismən çıxmasına səbəb olur. KM ilə FS 2 fraqmentlərinin ekspozisiya müddətindən asılı olaraq Mn<sup>2+</sup> ionlarının çıxımı artır. Bu isə EPR 2 signalının amplitudunun azalması ilə müşahidə olunur. Molekulyar oksigen üçün mediator olan metilviologenin (MV) əlavəsi parametrlərdə nəzərəçarpan dəyişiklik

yaratmır. FS 2 fraqmentlərinin 30 dəqiqəlik UB şüalanmaya məruz qalması (UFS – 2 filtri ilə) siqnal 2-nin amplitudu və formasına təsir etmir (şək.2). Hətta UB şüalanma 50 dəqiqəyə qədər artırıldıqda belə EPR 2 siqnalının forması və amplitudu nəzərə çarpan dərəcədə dəyişilmir. Göründüyü kimi kontrol və şüalanmış nümunələrdə EPR 2 siqnalları tam oxşardır. Yüksək tezlikli maqnit sahəsindən asılılıq ayrılmasının oxşarlığı da ona dəlalət edir ki, UB radiasiya EPR 2 siqnallarının mənbəyi olan tirazin radikallarına böyük dozalarda belə ciddi təsir göstərmir.



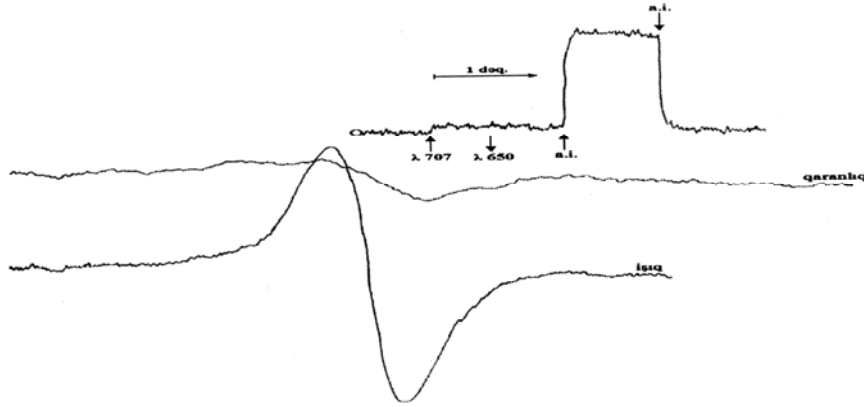
Şək. 1. FS 2 subxloroplast hissəciklərində EPR 2 siqnalı ( $g=2,0049$ ,  $\Delta H_{\max}=20Gs$ ). mod. = 3,2;  $\tau'=0,3''$ .

Yalnız  $Mn^{2+}$  siqnallarının əmələ gəlməsi görünür. UB şüalanmadan sonra ağ işığın verilməsi şüalanmadan əvvəl olduğu kimi siqnala nəzərə çarpmayan dərəcədə təsir edir. UB radiasiya EPR 2 siqnalının yüksək tezlikli elektromaqnit şüalanmanın gücündən asılılıq ayrılmasında dərkəskin dəyişiklik yaratmır. UB şüalanmaya məruz qalmış FS 2 fraqmentlərinə az miqdarda KM əlavə olunması kontrolda olduğu kimi EPR 2 siqnalının amplitudunu azaldır,  $Mn^{2+}$  siqnallarının çıxımını artırır. Qeyd etmək lazımdır ki, ağ işığın verilməsilə EPR 2 siqnalının amplitudu böyüyür. Daha zəif oksidləşdirici olan ferrosianidin əlavəsi ilə aşağıdakı dəyişikliklər baş verir. İlk növbədə  $Mn^{2+}$  ionlarının EPR siqnalı yoxa çıxır. EPR 2 siqnalı qaranlıqda böyüyür. Ağ işığın verilməsi ilə siqnalın böyüməsi müşahidə olunur. Kinetik dəyişmələrin analizi onu göstərir ki, işığın söndürülməsi ilə şərtlənən kinetikada fərqlər meydana çıxır. Belə ki, ferrosianidin əlavəsi ilə yarımdüşmə anı qısalır. Bu isə ferrosianidlə KM-in mühitdə oksidləşmə-reduksiya potensialının dəyişməsinə göstərir. FS 2 fraqmentlərində KM qatılığının artması siqnal 2-nin qaranlıqda tamamilə yox olmasına, işıqda isə yeni siqnalın (EPR 1') generasiyasına səbəb olur. Bu siqnal çox ehtimal ki, reaksiya mərkəzi  $P680^+$ -dən alınır.  $P 680$  kation radikalı KM-in iştirakı zamanı yüksək qatılığa malik olur. Bunun səbəbi donor hissəsində elektronun reaksiya mərkəzinə verilmə sürətinin zəifləməsi, akseptor hissədə isə  $P 680^+$  ilə  $Q_A$ -nın rekombinasiya sürətinin kəçilməsidir.



Şək.2. FS 2 subxloroplast fraqmentlərində EPR 2 siqnalının UB şüalanmanın müddətindən asılılığı. a – kontrol, b – 30 dəq. UB şüalanma, c– 50 dəq. UB şüalanma. Mod.=5Gs; güc.=  $3,2 \cdot 10^3$ ;  $\tau'=1''$ .

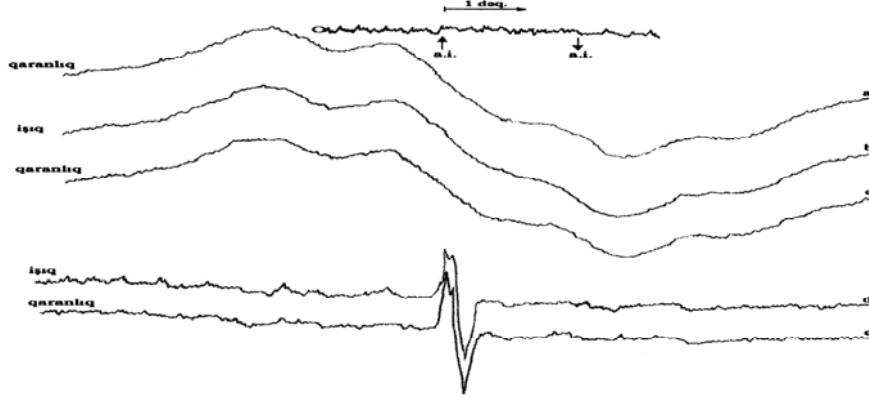
KM bilavasitə,  $Q_A$ -dan elektronu aldığından elektronlar artıq əks tərəfə getmir, başqa sözlə rekombinasiya baş vermir, nəticədə P680-nin stasionar qatılığı çoxalır. Şəkil 3-dən görüldüyü kimi müşahidə edilən EPR 1' siqnalı sinqlet olaraq  $g \sim 2,0025$ , eni 9 Qs-dur. Qeyd etmək lazımdır ki, müxtəlif spektral tərkibli işıqların ( $\lambda=707$  nm, uzaq qırmızı işıq;  $\lambda=650$  nm, yaxın qırmızı işıq) verilməsi EPR 1' siqnalının böyüməsinə gətirmir. Yüksək intensivlikli ağ işıq isə EPR 1' siqnalının kəskin böyüməsinə səbəb olur. Işığın söndürülməsi ilə siqnal sürətlə kiçilir. Növbəti təcrübələrdə UB şüalanmanın EPR 1' siqnalına təsirini öyrənmişik. Kiçik dozalarla şüalanma həmin siqnalın amplituduna və kinetikasına nəzərə çarpan dərəcədə təsir göstərmir. Lakin şüalanma müddəti artdıqca, başqa sözlə FS 2 fraqmentinin aldığı doza artdıqca həmin siqnalın amplitudu azalır, kinetikasında kəskin dəyişiklik baş verir. Ola bilsin ki, UB şüalanma FS 2-nin reaksiya mərkəzinə yalnız böyük dozalarda təsir edərək, orada destruktiv dəyişikliklər yaradır. Destruktiv dəyişikliklərin yaranması EPR 1' siqnalının amplitudunu azaldır. Sonrakı təcrübələrdə biz EPR 2 siqnalının amplitudunun KM – in mühitdə qatılığından asılılığını öyrənmişik. Çoxlu sayda apardığımız təcrübələr seriyası onu göstərir ki, bu asılılıq xəttidir. Qatılığın artması ilə EPR 2 siqnalı kiçilir, EPR 1' siqnalı isə xətti olaraq böyüyür. Bu isə bizim fikrimizlə, yəni EPR 2 siqnalının mənbəyi olan tirazinin destruksiyasının baş verməsinin elektronun reaksiya mərkəzinə verilmə sürətinin zəifləməsinin göstəricisi olduğunu sübut edir. Nəticədə kation radikalların miqdarı artır.



Şəkil 3. EPR 1' siqnalına müxtəlif intensivlikli işıqların təsiri

Sonrakı təcrübələrdə biz ionlaşdırıcı radiasiya olan  $\gamma$ - şüalanmanın stress amil kimi FS 2 subxloroplast hissəciklərinin paramaqnit mərkəzlərinə təsirini nəzərdən keçirmişik. Təcrübələrdə  $^{57}\text{CO}$  izotopu mənbəyi ilə fraqmentlər müxtəlif dozalara məruz qalmışdır. UB şüalanmadan fərqli olaraq  $\Delta H=2000$  Qs intervalında  $\text{Mn}^{2+}$  siqnallarını müşahidə etmirik. Şəkil 4-də ionlaşdırıcı radiasiyanın FS 2 subxloroplast hissəciklərində paramaqnit mərkəzlərinə təsirinə aid olan təcrübələr seriyası verilmişdir. Şəkildən görüldüyü kimi 10 dəq.  $\gamma$ -şüalanmaya məruz qalmış FS 2 hissəciklərində müşahidə olunan EPR 2 siqnalının 6 komponentindən heç biri dəyişikliyə uğramır. 100 Qs intervalında modul-

yasiyanın 5 Qs olmasına baxmayaraq çoxkomponentli EPR 2 siqnalında əlavə ifrat incə quruluşlu komponentlərə rast gəlinmir. İntensiv ağ işığın EPR rezonatoruna verilməsi, demək olar ki, siqnalın amplitudunu dəyişmir. İkinci komponentin maksimumunda maqnit sahəsinin fiksə olunması ilə şərtlənən kinetik dəyişikliklər işığın təsiri altında nəzərə çarpan dərəcədə dəyişilmir. İşığın söndürülməsi ilə yenidən qaranlıqda EPR 2 siqnalının



**Şək.4.** İonlaşdırıcı radiasiyanın FS 2 subxloroplast hissəciklərinin paramaqnit mərkəzlərinə təsiri. Mod.=5Qs, güc.= $3,2 \cdot 10^3$ ,  $\tau=1'$ .

qeydiyyatı əvvəlki işıqda və qaranlıqda olduğu kimi qalır. Geniş intervalda ( $\Delta H=2000Qs$ ) maqnit sahəsinə dəyişməklə ionlaşdırıcı radiasiyanın təsiri altında FS 2 səviyyəsində paramaqnit mərkəzlərin otaq temperaturunda həm işıqda, həm də qaranlıqda meydana çıxmasını sonrakı təcrübələrdə öyrənmişik. Göründüyü kimi (şək.4 d,e) bu geniş intervalda biz heç bir ionların siqnallarını müşahidə etmirik. Burada belə bir fikri qeyd etmək olar ki, otaq temperaturlarında müşahidə olunan sərbəst  $Mn^{2+}$  və  $Fe^{2+}$  kationları onların daxil olduğu yüksək incə quruluşları (suyu təşkil edən fermentativ kompleksi, elektronları FS 2 səviyyəsində alternativ daşıyan b-559 sitoxromunu və s.-ni) zədələmir.

Doğrudan da, EPR siqnallarını müşahidə etdiyimiz  $P680^+$  (EPR 1' siqnalı), tirazin amin turşusu (EPR 2 siqnalı) bu dozalarda ciddi dəyişikliyə uğramadığından otaq temperaturunda bu siqnalların forma və amplitudları dəyişməzlər. Lakin bunlardan fərqli olaraq FS 2 üçün stress amillərə qarşı həssas lokus olan suyu parçalayan fermentativ sistemdə dəyişikliklər baş verir. Biz bunu fermentativ sistemə daxil olan  $Mn^{2+}$  ionlarının həmin mərkəzdən çıxaraq paramaqnit şəklinə keçməsi kimi müşahidə edirik. Belə ki, həmin amillərin kiçik dozalarında belə nəzərə çarpan dərəcədə artıq həmin ionların 6 komponentli EPR siqnalı otaq temperaturunda müşahidə olunur. Dozanın artması ilə həmin siqnalın amplitudu artır. Təbii ki, aşağı temperaturalarda (maye helium  $4^\circ K$ , maye azot  $77^\circ K$ ) EPR tədqiqatları bizə imkan verərdi ki, FS 2-ni təşkil edən başqa paramaqnit mərkəzlərdə stress amillərin təsiri altındakı davranışlarını müşahidə edək. Bu Fe ionunu təşkil edən b-559 sitoxromuna, feofitin molekuluna, Fe ilə bağlı  $Q_A$  və  $Q_B$ -yə və s. aiddir. Radiasiya

amili olan  $\gamma$ -şüalanmanın FS 2 hissəciklərinə müxtəlif ekspozisiyaların təsiri zamanı EPR 2 və EPR 1' siqnallarının ona qarşı davamlı (tolerant) olduğunu müşahidə edirik. UB radiasiyadan fərqli olaraq ionlaşdırıcı radiasiyanın təsiri altında  $Mn^{2+}$  ionları sərbəst şəkildə ətraf mühitdə müşahidə olunmur. İonlaşdırıcı radiasiya FS 2 fraqmentlərində ENZ-ində ilk növbədə feofitin molekulunun bütövlüyünə təsir edərək elektron nəqliyyatını zədələyir. KM ilə işıqda müşahidə olunan EPR 1' siqnalı ionlaşdırıcı radiasiyanın böyük dozalarında qismən kiçilir. Ədəbiyyat məlumatlarından bilirik ki, ionlaşdırıcı radiasiya fotosintez prosesinə təsir edərək ilk növbədə fotosintezin energetikasına təsir edir. Bizim təcrübələr əsasında müəyyən edilmişdir ki, ionlaşdırıcı radiasiya FS 2-nin akseptor hissəsində feofitin molekuluna təsir edərək elektron nəqliyyatını zəiflədir. Lakin bu zaman FS 2 makrokompleksini təşkil edən başqa komponentlər, o cümlədən reaksiya mərkəzi P680, İTK, b-559 sitoxromu, D1 zülalı və s. kəskin dəyişikliyə uğramır. Doğrudan da, ionlaşdırıcı radiasiyanın paramaqnit mərkəzlərə təsirləri nəzərə çarpan dəyişikliklərə gətirmir.

### ƏDƏBİYYAT

1. Блюменфельд Л.А., Тихонов А.Н. // Электронный парамагнитный резонанс. СОЖ. №9. 1997. с.91-99.
2. Тихонов А.Н., Руге Э.К., Субчински В.К., Блюменфельд Л.А. // Исследование кинетики электронного транспорта и хроматических переходов в изолированных хлоропластах методом ЭПР. Физиология растений. - 1975. Т.22.
3. Халилов Р.И., Гольдфельд М.Г. Влияние ультрафиолетового излучения на электрон-транспортные реакции фотосинтеза. Доклады АН, 1992, т. 325, №3, стр. 609-612.
4. Allakhverdiev S.I., Sakamoto A., Nishiyama Y., Murata N. Inactivation of photosystem 1 and 2 in response to osmotic stress in *Synechococcus*: contribution of water channels // Plant Physiol. 2000b. V. 122. P. 1201—1208.
5. Klimov V.V., Allakhverdiyev S.I., Shuvalov V.A., Krasnovsky A.A. Effect of Extraction and Re-Addition of Manganese on light Reactions of PS2 Preparations // FEBS Lett. 1982. V. 148. P. 307-312.
6. Khalilov R.I., Nasibova A.N. Structurally functional changes of photosystem 2 at UV – irradiation.// Natural cataclysms and global problems of the modern civilization. Baku-2007. P. 507-511.
7. Nasibova A.N., Qasumov R.D., Aliyev L.A., Khalilov R.I. Influence of radiating on electron transport in chloroplasts.// The fourth Eurasian conference on Nuclear science and its application, 31 okt-03nov., Baku-2006.P. 177.

### ВЛИЯНИЕ РАДИОЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПАРАМАГНИТНЫЕ СВОЙСТВА ВО ФРАГМЕНТАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2.

Р.И.ХАЛИЛОВ, А.Н.НАСИБОВА

### РЕЗЮМЕ

В данной работе исследовано влияние радиоэкологических факторов на парамагнитные свойства в субхлоропластных частицах фотосистемы 2. Обнаружено, что эти факторы не оказывают серьезное влияние на сигнал ЭПР 2. Иными словами, тиразиновые радикалы, которые являются источником этого сигнала не подвергаются

сильным изменениям. С добавлением сильного акцептора КМ на свету во фрагментах ФС 2 индуцируется синглетный сигнал ЭПР1' и при этом уменьшается амплитуда сигнала ЭПР 2. Одновременно наблюдается увеличение сигнала ЭПР  $Mn^{2+}$ .

**INFLUENCE OF RADIOECOLOGICAL FACTORS ON PARAMAGNETIC  
PROPERTIES IN FRAGMENTS OF PHOTOSYSTEM 2.**

**R.I.KHALILOV, A.N.NASIBOVA**

**SUMMARY**

In the given work is investigated the influence of radioecological factors on paramagnetic properties in subchloroplasts particles of photosystem 2. It is revealed, that these factors do not render serious influence on signal EPR 2. Differently, tirozin radicals which are source of this signal are not exposed to strong changes. With addition of a strong acceptor of КМ in fragments PS 2 is induced signal EPR 1' on light and thus the amplitude of signal EPR 2 is decreases. Simultaneously is observed increase of signal EPR of  $Mn^{2+}$ .