

UOT 541.64:547.458.6

POLİ-N-VİNİLPİRROLİDONUN METAL KOMPLEKSLƏRİNƏ TRİPSİNİN İMMOBİLİZASİYASININ TƏDQIQI

Ş.Z.Tapdıqov, N.A.Zeynalov, İ.D.Əhmədov, H.Q.Nurullayev, S.H.Məmmədova

AMEA-nın P.M.F.Nağıyev ad. Kimya Problemləri İnstitutu

E-mail:shamotapdiqov@mail.ru

Orta molekül kütləsi $M_n=4 \times 10^4$ olan poli-N-vinilpirrolidonun N,N-metilen-bis-akrilamidlə tikilməsindən alınan hidrogelin Cu(II), Co(II) və Ni(II) komplekslərinə tripsinin immobilizasiyası tədqiq edilmişdir. Immobilizasiya olunmuş tripsinin polimer daşıyıcıdan ayrılmasına mühitin pH-n təsiri öyrənilmişdir. Bununla yanaşı, alınan komplekslərin quruluşu İQ-Furye və UB spektroskopik üsullarla identifikasiya edilmişdir.

Açar sözlər: Poli-N-vinilpirrolidon, hidrogel, immobilizasiya, tripsin

Son illərdə makromolekulyar kimya sahəsində perspektiv istiqamətlərdən biri bioloji aktiv birləşmələrin (BAB) daşınması üçün polimer hidrogellərin alınmasıdır. BAB-n polimer daşıyıcılara immobilizə olunması onların farmokoloji xüsusiyyətlərini yaxşılaşdırır, təsir müddətini və aktivliyini artırır, toksikliyinə azaldır, zədələnmiş orqanlara təsir qüvvəsini çoxaldır və hətta saxlanılma zamanı stabilliyini artırır [1,2].

Bununla yanaşı, sintez olunmuş polimer hidrogellərin bioloji vacib metallarla komplekslərinin alınması və onlara BAB-n immobilizə olunması istiqamətində aparılan tədqiqat işləri də aktualdır və böyük maraq doğurur. Həm də, hesab etmək olar ki, polimerlərin metal kompleksləri canlı orqanizm üçün defisit mikroelementlərin həlli probleminə də təsir etməyə qadirdirlər.

Etilendiamin, dietilentriamin liqandları saxlayan heteroməsəmali polistirolun Co(II), Ni(II), Cu(II) və Fe(II) ionları ilə komplekslərinə pensillinamidhidrolaz fermentinin immobilizasiya olunması prosesi öyrənilmiş [3], müəyyən edilmişdir ki, metal ionları, immobilizə olunan fermentin miqdarını artırmaqla bərabər onun stabilliyinə də müsbət təsir göstərir. Digər bir işdə [4] xitozan-silikagel makroməsəmali gel ilə Cu(II) ionun kompleksinə tripsinin immobilizasiyası tədqiq edilmiş, bir həftə ərzində 4⁰C-də tripsinin 80% aktivliyinin saxlanılması müəyyən olunmuşdur.

2-hidroksietil metakrilat ilə N-metakriloil-(1)-sisteinin metil efiri əsasında alınan gelin Fe(III) ionları ilə kompleksi (12.7

mmol/qr) sintez olunmuşdur. Alınan metal gel kompleksə katalaza fermentinin immobilizasiyası tədqiq edilmiş və müəyyən olunmuşdur ki, fermentə görə gelin tutumu maksimum pH 5-də olub, 192 mq/qr təşkil edir. Immobilizə olunmuş ferment pH-n 5.5-7.0 intervalında 10 dəfə təkrar istifadə zamanı 76% katalitik aktivliyini saxlayır [5].

Polietilenqlikol-dimetakrilat və N-vinilimidazol əsaslı hidrogelin Cu(II) kompleksinə α -amilaza fermentinin immobilizasiyası öyrənilmişdir [6]. Göstərilmişdir ki, fermentin maksimum immobilizasiyası pH 4-də olub 38.9 mq/qr təşkil edir.

Digər bir işdə [7] qlutaraldehyd ilə jelatinin tikilməsindən alınan hidrogelin TiCl₄ ilə kompleksinə qlükoamilaza fermentinin immobilizasiyası tədqiq olunmuş və immobilizasiyada metal ionunun körpü rolu oynadığı müəyyənləşdirilmişdir.

Bu sahədə çoxlu sayda tədqiqat işlərinin aparılmasına baxmayaraq hələ də BAB-n daşınması üçün yeni növ polimer hidrogellərin sintez olunması aktual problem kimi qalmaqdadır. Bu məqsədlə tədqiqat işində aşağı molekül çəkili poli-N-vinilpirrolidon (PVPr) əsasında alınan hidrogelin Cu(II), Co(II) və Ni(II) komplekslərinə tripsinin immobilizasiyası tədqiq edilmişdir. Immobilizasiya olunan fermentin mühitin pH-n təsirindən məhlula ayrılması və fermentin təsir müddətinin artırılması öyrənilmişdir. Eyni zamanda, alınan komplekslərin quruluşu İQ-Furye və UB spektroskopik üsullarla tədqiq edilmişdir.

TƏCRÜBİ HİSSƏ

İşdə orta molekul kütləsi $M_n=4 \times 10^4$ olan PVPr məlum metodika [8] üzrə sintez olunmuşdur. M_n viskozimetrik üsulla təyin olunmuşdur (həllədiçi H_2O , $T=20^0C$). Tikici reagent kimi klassifikasiyası “kimyəvi təmiz” (k.t) olan N,N –metilen-bis-akrilamid (MBAD) (Sigma) götürülmüşdür. PVPr-n MBAD vasitəsi ilə tikilməsi civə-kvars lampasından (PRK-4) mənbə kimi istifadə etməklə 8 saat müddətində $35-40^0C$ -də ultrabənövşəyi şüa təsiri ilə aparılmışdır.

Mühitin turşuluğunu sabit saxlamaq üçün standart titrli fiksantlardan istifadə olunmuşdur: 0.05 M $KH_3C_4O_3 \cdot 2H_2O$ (pH 1.68), 0.01 n HCl (pH 2), $KC_4H_5O_6$ (pH 4.01), 1 n CH_3COOH və 1n NaOH (pH 6.7) H_3BO_3 və 0.1 n HCl (pH 8.27 və 7.4), H_3BO_3 və 0.1 n NaOH (pH 9.4, 10.5 və 11). Mühitin pH-ı WATER QUALITY Cheeker V-10 cihazı ilə (Japan) ölçülmüşdür.

Alınmış PVPr əsaslı hidogelin Cu(II), Co(II) və Ni(II) ionları ilə komplekslərinin alınması və sorbsiya tutumlarının öyrənilməsi [9] işində tədqiq olunmuşdur.

Tripsin (*Biofarma*) Ukraniya istehsalıdır. Məhlulda tripsinin qatılığı Specord UV-VİS cihazında (Carl Zeis) 280 nm-də standart qatılıqlı tripsin məhlullarının (tripsinin molyar işıq udma əmsali $E_{1\%}^{1cm}=14$) optiki sıxlıqlarının ölçülməsinə əsasən təyin olunmuş [10], dərəcəli qrafik qurulmuşdur. Fermentin küvetdə qatılığı $C=1,1 \times 10^{-6}$ M təşkil edir.

Fermentin immobilizasiyası [11] metodikasına uyğun aparılmış, fermentin daşıyıcıya immobilizə olunan miqdarı M (mq) və tripsinə nəzərən gəlin tutumu M_f (mq/qr) aşağıdakı ifadələrə əsasən təyin olunur:

$$M = (C_0 - C_t) \times V_i \quad M_f = \frac{(C_0 - C_t)}{g} \times V_i$$

C_0 – ferment məhlulunun ilkin qatılığı, mq/l

C_t – immobilizasiyadan sonra məhluldakı fermentin tarazlıq qatılığı, mq/l

V_i – immobilizasiya gedən məhlulun həcmi, ml

g - daşıyıcının kütləsi, qr

Daşıyıcıya fermentin immobilizasiya olunma dərəcəsi R (%) və mühitin pH-nın təsirindən məhlula ayrılan miqdarı D (%) isə [11] aşağıdakı ifadələrə əsasən hesablanmışdır:

$$R = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} \times 100 \quad D = \frac{C_t \times V_i}{10 \times M_{max}}$$

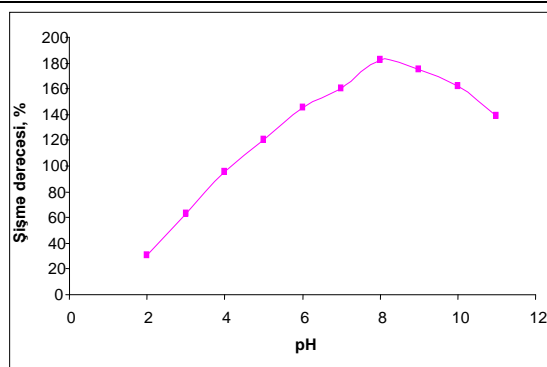
M_{max} –daşıyıcıya immobilizə olunan fermentin maksimum miqdarı, mq

Alınan polimer-Me(II)-ferment komplekslərinin quruluşu 1000-4000 sm^{-1} intervalında İQ-Furye (Varian) və UB spektroskopik üsullarla (Carl Zeis, SPECORD UV-VİS) identifikasiya edilmişdir.

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Hidrogellərə immobilizə olunan BAB-n daşıyıcıdan hansı sürətlə ayrılması qarşıya qoyulan əsas məsələlərdən biridir. Bir sıra şərtləri, məs. hidrogelin şişmə dərəcəsinə, mühitin pH-nı, temperaturu və yaxud kimyəvi tərkibi dəyişməklə BAB-n ayrılma sürətini tənzimləmək olar. Bu baxımdan tədqiq olunan

işdə PVPr-Me(II) komplekslərinə tripsinin immobilizasiya edilməsi üçün orta molekul kütləsi $M_n=4 \times 10^4$ olan PVPr-n 10% MBAD ilə tikilməsindən alınan hidrogelin şişmə dərəcəsinin pH-dan asılılığı öyrənilmiş və nəticələr şəkil 1-də verilmişdir.



Şəkil 1. PVPr əsaslı hidrogelin şişmə dərəcəsinin mühitin pH-dan asılılıq əyrisi.

Şəkil 1-dən görünür ki, PVPr əsaslı hidrogelin maksimum şişmə dərəcəsi pH 8-də olur. Hidrogelin pH 8-də yüksək şişmə dərəcəsinə malik olması tripsinin katalitik aktivlik göstərdiyi mühitə uyğundur (pH=7.8-8.0) [12]. Immobilizasiya olunan tripsinin miqdarının metal ionlarının təbiətindən asılılığı cədvəl 1-də verilmişdir.

Cədvəl 1. PVPr əsaslı daşıyıcının metal komplekslərinin xarakteristikası və immobilizə olunmuş tripsinin miqdarı göstəriciləri. $C_{0 \text{ tripsin}}=40 \text{ mq/l}$, $V_i=5 \text{ ml}$, $T=293 \text{ K}$, $\tau=24 \text{ saat}$, $M_n=4 \times 10^4$

| Metal ionu | F , mmol/qr | Daşıyıcıdakı Me (II) ionu, %-lə | C_t tripsin, mq/l | ΔC tripsin, mq/l | M Immobilizə olunan tripsinin miqdarı, mq | M_f Daşıyıcıdakı fermentin miqdarı, mq/qr | R Immobilizasiya Dərəcəsi, % |
|------------|---------------|---------------------------------|---------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|
| Cu (II) | 0.58 | 0.37 | 22.00 | 18.0 | 0.360 | 3.60 | 72.35 |
| Co (II) | 0.52 | 0.30 | 23.50 | 16.5 | 0.330 | 3.30 | 66.70 |
| Ni (II) | 0.54 | 0.35 | 22.80 | 17.2 | 0.344 | 3.44 | 68.80 |

F -daşıyıcının tərkibindəki uyğun metal ionunun miqdarı

Cədvəl 1-dən görüldüyü kimi PVPr əsaslı hidrogelin metal ionları ilə kompleksləri, tərkiblərində metal ionlarının miqdarının az olması ilə seçilir. Bu miqdar, Cu(II), Co(II) və Ni(II) ionlarının bioloji vacib mikroelement kimi tibbi tətbiqində əlverişlidir. Hər üç metal ionunun vasitəsilə immobilizasiya olunan tripsinin miqdarının tərkibində metal ionları olmayan hidrogel ilə [13] müqayisədə artması müşahidə olunur.

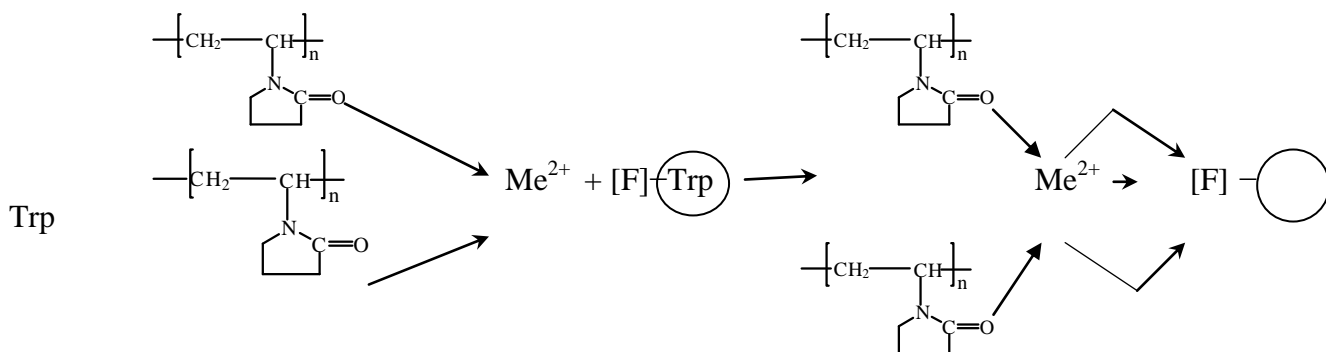
Məlumdur ki, fermentlərin ayrılmasına təsir edən faktorlardan biri də mühitin turşuluğudur. Bu baxımdan $M_n=4 \times 10^4$ olan PVPr əsaslı hidrogelin metal komplekslərinə immobilizasiya olunmuş tripsinin pH-n müxtəlif qiymətlərində yenidən məhlula ayrılması tədqiq edilmiş və alınan nəticələr cədvəl 2-də verilmişdir.

Cədvəl 2. PVPr əsaslı hidrogelin metal komplekslərinə immobilizə olunmuş tripsinin məhlula ayrılmasının pH-dan asılılığının nəticələri. $V_{\text{bufer}}=5 \text{ ml}$, $m_{\text{daş+tripsin}}=0.1 \text{ qr}$, $T=293 \text{ K}$, $\tau=24 \text{ saat}$.

| pH | PVPr-Cu (II) $M_n=4 \times 10^4$ | | | PVPr-Co (II) $M_n=4 \times 10^4$ | | | PVPr-Ni (II) $M_n=4 \times 10^4$ | | |
|----|-------------------------------------|----------|---------|-------------------------------------|----------|---------|-------------------------------------|----------|---------|
| | C_t , mq/l | m , mq | D , % | C_t , mq/l | m , mq | D , % | C_t , mq/l | m , mq | D , % |
| 1 | 14.60 | 0.290 | 80.55 | 14.70 | 0.294 | 89.09 | 14.40 | 0.288 | 83.72 |
| 2 | 14.20 | 0.284 | 78.89 | 13.80 | 0.276 | 83.64 | 12.60 | 0.252 | 73.26 |
| 3 | 14.00 | 0.280 | 77.78 | 13.50 | 0.270 | 81.82 | 11.50 | 0.230 | 66.75 |
| 4 | 12.00 | 0.240 | 66.67 | 11.00 | 0.220 | 66.67 | 8.60 | 0.172 | 50.00 |
| 5 | 9.50 | 0.190 | 52.78 | 8.25 | 0.165 | 50.00 | 6.70 | 0.134 | 38.95 |
| 6 | 6.50 | 0.130 | 36.12 | 6.00 | 0.120 | 36.36 | 4.50 | 0.090 | 26.16 |
| 7 | 4.00 | 0.080 | 22.23 | 3.50 | 0.070 | 21.21 | 3.00 | 0.060 | 17.44 |
| 8 | 2.50 | 0.050 | 13.89 | 2.00 | 0.040 | 12.12 | 2.25 | 0.045 | 13.08 |
| 9 | 1.00 | 0.020 | 5.56 | 1.00 | 0.020 | 6.06 | 1.05 | 0.021 | 6.10 |

Cədvəl 2-dən görünür ki, PVPr əsaslı hidrogelin metal komplekslərinə immobilizasiya olunmuş tripsinin məhlulda ayrılması pH-n 1-4 qiymətlərində 90-60% təşkil edir. Bu hal pH-n aşağı qiymətlərində metal ionlarının desorbsiya olunması ilə əlaqədardır. Bununla yanaşı, pH artdıqca tripsinin ayrılma faizi

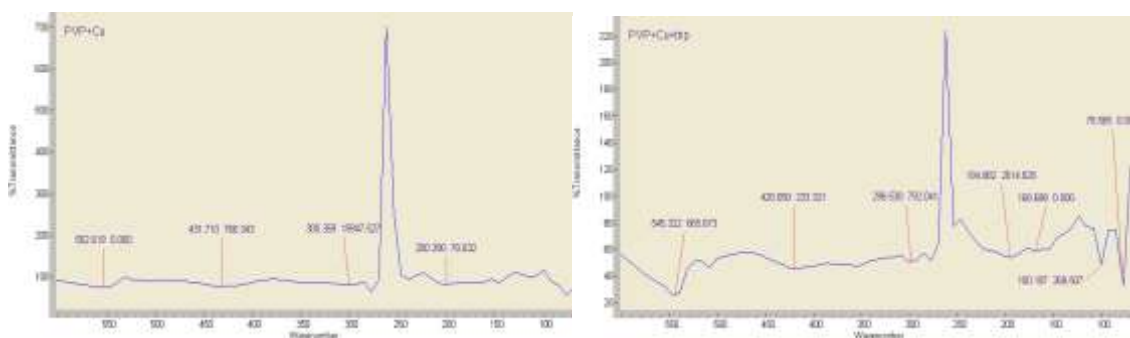
aşağı düşür. Bu isə pH-n 7-8 qiymətlərində hidrogelin metal ionları vasitəsilə tripsin ilə əmələ gətirdiyi komplekslərin davamlı olması ilə izah oluna bilər. Metal ionlarının kompleksəmələgəlmədə körpü rolunu oynadığını bilərək [3,14] immobilizasiyanın sxemini aşağıdakı kimi vermək olar.



F- tripsinin tərkibində olan funksional qrupları göstərir.

PVPr əsaslı hidrogelin, onun Cu(II) və tripsin ilə komplekslərinin quruluşu İQ-Furye spektroskopik üsulla öyrənilmişdir. Müəyyən olunmuşdur ki, hidrogelin İQ spektrində aşağıdakı udma zolaqları - 3415, 2955, 2130, 1655, 1291, 931, 648, 576 sm^{-1} , onun Cu(II) ilə kompleksində isə 3419, 2132, 1659, 941, 658 sm^{-1} zolaqları müşahidə olunur. Tripsinin

immobilizasiyasından sonra isə spektrin xarakterik zolaqları aşağıdakı kimidir: 3410, 2137, 1655, 1228, 1020, 651, 573 sm^{-1} . PVPr əsaslı hidrogelin Cu(II) kompleksinə tripsinin immobilizasiya olunmasını daha ətraflı öyrənmək üçün nümunələrin 50-600 sm^{-1} intervalında İQ-Furye spektrləri tədqiq olunmuşdur (şəkil 2).



Şəkil 2. PVPr-Cu(II) kompleksinin və PVPr-Cu(II)-Tripsin üçlü kompleksin 50-600 sm^{-1} intervalında İQ Furye spektri

Şəkil 2-dən görünür ki, PVPr-n Cu(II) ilə kompleksində 553, 431, 300, 200 sm^{-1} udma zolaqları müşahidə olunur. Ferment makromolekulu ilə əmələ gələn kompleksdə isə yuxarıdakı udma zolaqlarında qısa dalğa sahəsində sürüşmə baş verir: 545, 420, 298, 194 sm^{-1} . Eyni zamanda, üçlü kompleksdə 168, 100 və 78 sm^{-1} yeni udma zolaqları əmələ gəlir.

İQ-Furye spektroskopik üsulla hidrogelin Co(II), Ni(II) və tripsin ilə quruluşlarının öyrənilməsi alınan nəticələrin Cu(II) kompleksi ilə analogi olduğunu göstərir.

Kompleksəmələgəlmə həmçinin müxtəlif pH-larda, model olaraq PVPr-n sulu məhlulunda Cu(II), Co(II), Ni(II) və tripsin ilə üçlü komplekslərinin quruluşu UB spektroskopik üsulla öyrənilmişdir. PVPr-n

metal ionları və tripsin ilə komplekslərinin də verilmişdir. müxtəlif pH-larda λ_{\max} -n qiymətləri cədvəl 2-

Cədvəl 2. PVP_r əsaslı hidrogelin metal ionları və tripsin ilə komplekslərinin müxtəlif pH-larda λ_{\max} -n qiymətləri. $l_{\text{küvet}} = 1 \text{ sm}$, $C_{\text{PVP}_r} = 1.2 \times 10^{-4} \text{ qr/l}$, $C_{\text{Me(II)}} \approx 0.6 \text{ mM}$, $C_{\text{tripsin}} = 1.1 \times 10^{-6} \text{ M}$

| Nümunələr | λ_{\max} , nm | Nümunələr | λ_{\max} , nm | Nümunələr | λ_{\max} , nm |
|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| PVPr-Cu(II) | 207.0 | PVPr-Co(II) | 206.2 | PVPr-Ni(II) | 207.0 |
| PVPr-Cu(II)-Trp-pH3.56 | 206.5 | PVPr-Co(II)-Trp-pH3.56 | 206.0 | PVPr-Ni(II)-Trp-pH3.56 | 206.3 |
| PVPr-Cu(II)-Trp-pH4.01 | 205.6 | PVPr-Co(II)-Trp-pH4.01 | 205.0 | PVPr-Ni(II)-Trp-pH4.01 | 205.0 |
| PVPr-Cu(II)-Trp-pH5.50 | 207.8 | PVPr-Co(II)-Trp-pH5.50 | 208.0 | PVPr-Ni(II)-Trp-pH5.50 | 204.6 |
| PVPr-Cu(II)-Trp-pH6.70 | 206.7 | PVPr-Co(II)-Trp-pH6.70 | 207.0 | PVPr-Ni(II)-Trp-pH6.70 | 205.0 |
| PVPr-Cu(II)-Trp-pH7.40 | 206.0 | PVPr-Co(II)-Trp-pH7.40 | 206.0 | PVPr-Ni(II)-Trp-pH7.40 | 205.3 |
| PVPr-Cu(II)-Trp-pH8.20 | 206.6 | PVPr-Co(II)-Trp-pH8.20 | 207.0 | PVPr-Ni(II)-Trp-pH8.20 | 205.7 |

Cədvəl 2-dən görünür ki, PVPr-n metal ionları ilə komplekslərinin əmələgəlməsi pikin intensivliyinin azalması və böyük dalğa uzunluğu tərəfə sürüşməsi ilə müşahidə olunur. Metal-polimer-tripsin komplekslərinin əmələgəlməsi zamanı isə udulmanın artması və qısa dalğa uzunluğu tərəfə sürüşməsi baş verir.

Beləliklə, müəyyən olunmuşdur ki, PVPr əsaslı hidrogelin Cu(II), Co(II) və Ni(II)

komplekslərinə immobilizə olunmuş tripsin sərbəst tripsinə nisbətən daha davamlıdır. Immobilizə olunmuş tripsinin 90-60%-n pH-n aşağı qiymətlərində məhlula ayrılmasına baxmayaraq, pH artıqca tripsinin ayrılma %-i aşağı düşür və eyni zamanda tripsinin ayrılması müddəti artır. Bu isə tripsinin metal ionları ilə əmələ gətirdiyi rəbitənin daha güclü olması ilə əlaqədardır.

ƏDƏBİYYAT

1. Валуев Л.И., Валуева Т.А., Платэ Н.А. и др. //Успехи биологической химии, 2003.т.43.С.308-309.
2. Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашов А.В. и др. Имобилизованные ферменты. М.: Высшая школа. 1987. 159 с.
3. Ямсков И.А., Буданов М.В., Даванков В.А.//Биоорганическая химия. 1980.Том 6.№9. С.1404- 1409.
4. Jianmin Wu, Mingming Luan, Jiayin Zhao. //I.J. Biological Macromolecules. 2006. V.39. Iss. 4-5. P.185-191.
5. Sarı M., Akgöl S., Karataş M., Denizli A.// Ind. Eng. Chem. Res, 2006. V.45. İss.9. P.3036–3043.
6. Karaa A., Osmana B., Yavuz H., Beşirlia N., Denizli A.//Reactive and Functional Polymers. 2005.V.62. Iss 1. P.61-68.
7. Kennedy J.F., Kalogerakis B.// Biochimie. 1980. V.62 № 8-9. С.549-561.
8. Сидельковская Ф.П. Химия N-винил-пирролидона и его полимеров. М.:Наука.1970. 150.с
9. Zeynalov N.A., Tapdıqov Ş.Z., Əhmədov İ.D.və başq.// Azərb. Kimya Jurnalı. 2009. №2. s.39-44.
10. Файзуллин Д.А., Ступишина Е.А., За-Харченко Н.Л.и др.// VIII Всероссийская конференция “Структура и динамика молекулярных систем”. 2001 г. С.61-62.
11. Ding L., Li Y., Jiang Y., Cao Z., Huang J.//Chinese J. Polymer Science. 2000. v.18. № 4. P.343-349.
12. Tapdıqov Ş.Z.// AMEA Aspirantların Elmi Konfransının Materialları. Bakı. 2009. s.188-190.
13. Тапдыгов Ш.З., Зейналов Н.А., Ахмедов И.Д.и др.// XXIV Международная Чугаевская конференция по координационной химии. Тезисы Докладов. Санкт-Петербург 2009.с.598.
- 14.Помогайло А.Д. «Полимерные иммобилизованные металлокомплексные катализаторы». М.Наука. 1988. 303 с.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ ТРИПСИНА НА КОМПЛЕКСЫ МЕТАЛЛОВ
С ПОЛИ-N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНОМ**

Ш.З.Тардыгов, Н.А.Зейналов, И.Д.Ахмедов, Г.Г.Нуруллаев, С.Г.Мамедова

Исследована иммобилизация трипсина на гидрогель, полученного сшиванием N,N-метилден-бис-акриламидом поли-N-винилпирролидона со средней молекулярной массой $M_{\eta}=4 \times 10^4$ с комплексами Cu(II), Co(II) и Ni(II). Изучено влияние pH среды на выделение иммобилизованного трипсина с полимера-носителя. Наряду с этим, идентифицированы структуры полученных комплексов методами ИК-Фурье и УФ-спектроскопии.

**ANALYSIS OF TRYPSIN IMMOBILIZATION ON METAL COMPLEXES WITH
POLY-N-VINYLPYRROLIDONE**

Sh.Z.Tardiyov, N.A.Zeynalov, I.D.Ahmedov, Q.Q.Nurullaev, S.Q.Mamedova

The immobilization of trypsin on hydrogel obtained by crosslinking of N,N-methylen-bis-acrylamide poly-N-vinylpyrrolidone with apparent molecular weight $M_{\eta}=4 \times 10^4$ with Cu(II), Co(II) and Ni(II) complexes has been studied. Also the influence of pH environment on extraction of immobilized trypsin from polymer supporter analysed. Along with this, the structures of obtained complexes by IR-Furye and UF spectroscopy methods identified.