

активными вскоре после образования первых зрелых яйцеклеток в гермафродитной железе. С этого времени слизни приступают к активной отдаче семенной жидкости. Рост тела окончательно останавливается.

**Жизненный цикл.** Половозрелость наступает в сентябре. Общая длина спермы половозрелых особей - 148,2 мкм; длина головки 8,58 мкм; ширина 2,86 мкм; ширина тела 2,08 мкм. Копулирующие особи встречаются до середины октября. Откладка яиц происходит через 15 – 20 дней после копуляции. Инкубационный период при температуре 18 - 21<sup>0</sup> длится 26 – 35 дней. Яйца округло-овальные, размеры от 1,4x1,6 до 2,5x1,6 мм. Только что вылупившиеся из яиц молодые имеют следующие размеры: при движении длина тела 5,3 – 5,5 мм, ширина 0,8 – 1,0 мм. При покое длина тела 3,4 – 3,6 мм, ширина 1,1 – 1,3 мм.

По основным особенностям жизненного цикла и длительности жизни *D. sturanyi* относится к однолетнему виду. В условиях Заилийского Алатау, жизненный цикл, начавшись с вылупления молодых из яиц в апреле, через 7 – 8 месяцев заканчивается размножением и откладкой яиц. Вскоре, через 3 – 5 дней после откладки яиц, взрослые особи гибнут. На зимовку остаются только яйца. К аналогичному выводу пришла и Kosinska M. [4], которая изучила жизненный цикл вида в 1970 – 1976 гг. в условиях Польши. По ее данным продолжительность жизни в условиях Польши в среднем 214 дней, из них на ювенильную фазу приходится в среднем 65 дней репродуктивный период – 88 дней.

**Распространение и местообитание.** В Казахстане – Заилийский Алатау, сады г. Алматы и Алматинской области. Одна находка сделана в бассейне р. Талас, близ г. Тараз и две находки - в пойме р. Иртыш около г. Павлодар. Вне Казахстана - обнаружен в нескольких местах Московской, Калининской, Воронежской областях, а также в ботанических садах и на пригородных полях и огородах Ленинграда, Челябинска, Ростова-на-Дону, Ленинабада и Хорога [3]. Обитает на открытых, умеренно влажных и очень влажных местах, особенно часто в различных антропогенных биотопах: вторичные кустарники, сады, парки, огороды, пустоши, а также на лугах и в придорожных канавах. Питается зелеными частями растений, плодами и овощами.

#### Литература

1 Лихарев И. М., Виктор А. Й. Слизни фауны СССР и сопредельных стран (*Gastropoda terrestria nuda*). – Л.: Наука, 1980. -Т. III, вып 5. – С. 437.

2 Рымжанов Т. С. Брачные игры и механизм копуляции у *Turkomilax natalianus* (Michaelis, 1892) (*Mollusca, Gastropoda Terrestria Nuda*) в условиях Заилийского Алатау. //Известия НАН Республики Казахстан, Серия биол., 1993, № 1, С. 72 – 75.

3 Рымжанов Т. С. Брачные игры и механизм копуляции у слизней рода *Deroceras* (*Mollusca Gastropoda Terrestria Nuda*) в условиях Заилийского Алатау. //Известия НАН РК, 1994, № 4, С. 28-33.

4 Kosinska M. The life cycle of *Deroceras sturanyi* (Simroth, 1894) (*Pulmonata, Limacidae*) // Zool. Polon. 1980. - V. 28, N 2. - P. 113 – 155.

#### Тұжырым

Іле Алатауы жағдайында Қазақстанның тау аймақтарында кең таралған *Turkomilax* (Michaelis) *natalianus* (Michaelis, 1892) және *Deroceras* (*Deroceras*) *sturanyi* (Simroth, 1894) өмір ұзақтылығы зерттелген.

#### Summary

In the conditions of Ili of Alatau is studied the life cycle of *Turkomilax* (Michaelis) *natalianus* (Michaelis, 1892) and *Deroceras* (*Deroceras*) *sturanyi* (Simroth, 1894).

Мусина А.А., Алтыбаева Н.А., Бисенбаев А.К.  
**ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ФИТОГОРМОНОВ НА ЛИПОКСИГЕНАЗНУЮ СИСТЕМУ  
 И ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ  
 В АЛЕЙРОНОВОМ СЛОЕ ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ**  
 (Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

*В ходе прорастания зерна пшеницы выявлено четыре типа липоксигеназ. Эти типы липоксигеназ охарактеризованы по каталитическому рН оптимуму и по характеру активации в ходе прорастания зерна пшеницы. Показано, что под действием ГК в клетках алейронового слоя усиливается активность липоксигеназ с нейтральным и щелочным значением рН, это действие фитогормона сопровождалось усилением накопления малонового диальдегида. Действие АБК в данной модельной системе направлено, наоборот, на подавление активности липоксигеназ. Высказано предположение об участии липоксигеназ в генерации радикалов кислорода в клетках алейронового слоя зерна пшеницы.*

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) — окислительная деградация липидов происходящая, в основном, под действием радикалов кислорода и/или липоксигеназ.

Известно, что в растениях липоксигеназы играют ключевую роль в процессе перекисного окисления ненасыщенных высших жирных кислот (НВЖК), линолевой, линоленовой и арахидоновой, катализируется липоксигеназой (КФ 1.13.11.12.), или линолеат: O<sub>2</sub>- оксидоредуктазой, ферментом, широко распространенным в растительном мире. Процесс перекисного окисления усиливается вторичным образованием из липидов высоко реакционно-способных и легко диффундирующих радикалов, которые могут опосредованно или непосредственно привести к запуску гибели клеток [1].

Эти данные указывают на важную роль липоксигеназ и высоко реакционно-активных продуктов их активации в реализации ПГК клеток растений.

#### Материалы и методы

В исследованиях использовали семена гексаплоидной пшеницы (*Triticum aestivum*) сорта Казахстанская 4. Изолированные алейроновые слои выделяли по методике описанной в работе [2]. Алейроновые слои инкубировали (15-20 алейроновых слоя на 2 мл) в буфере содержащем 0,2мМ натрий-ацетата (рН5.0), хлорамфеникол (25мкг/мл) и/или стрептомицин (5мкг/мл). ГК, АБК добавляли в фиксированных концентрациях как указано в тексте и графиках. В контрольных вариантах ГК и АБК исключали из среды инкубации.

Перекисное окисление липидов в алейроновом слое анализировалось путем измерения содержания малонового диальдегида, продукта разложения окисления полиненасыщенных жирных кислот. 50 мг алейроновой ткани гомогенизировали в 1 мл охлажденного реагента (0.25% (w/v) тиобарбитуровой кислоты в 10% (w/v) растворе трихлоруксусной кислоты). Поглощение супернатанта определялось как значение абсорбции при 532 нм минус значение неспецифического поглощения при 600 нм. Все эксперименты проводились в трех независимых повторениях [3].

Активность изоферментов липоксигеназы определяли при длине волны 234 нм в присутствии линолевой кислоты. Экстракты (100 мг/мл) были приготовлены на основе 0.05М Трис-ацетатного буфера. За одну единицу липоксигеназной активности использовали количество фермента, вызывающее изменение одной единицы поглощения реакционной смеси (1.0 мл) за 1 мин при 234 нм.[4].

#### Результаты и их обсуждение

В первоначальных исследованиях мы изучали характер активации различных форм липоксигеназ алейронового слоя зерна пшеницы в ходе прорастания (1, 2 и 3 дневные проростки). Для определения активности липоксигеназ в качестве субстрата использовали линолеовую кислоту.

Известно, что для большинства известных в настоящее время ферментов определен оптимум рН, при котором они обладают максимальной активностью. Эта величина важный критерий, служащий для характеристик фермента.

Известно, что многие виды растений содержат множественные формы липоксигеназ (изоферменты). В растениях липоксигеназы 9 - LOX и 13 - LOX катализируют окисление ненасыщенных жирных кислот C<sub>18</sub> линолевой и линоленовой кислоты до 9- и 13 – гидроперекиси. Субстратом для 15- LOX является арахидоновая (C<sub>20</sub>) кислота. Показано, что липоксигеназ специфичных к ненасыщенным жирным кислотам (C<sub>18</sub>) и их эфирам можно различить по их рН оптимуму.

В связи с этим различные изоформы фермента в ходе выполнения работы дифференцированы на основе их рН оптимума. В ходе проведенных экспериментов использованы различные буферные системы с определенными значениями рН (Трис - боратный буфер рН 4,5 ; 5,0; 5,5; 8-9, 0,02М натрий фосфатный буфер, рН 6.0 - 7.0;).

Активность липоксигеназы в проростках пшеницы, семена которых замачивали в буферных системах, проявлялась своеобразной динамикой и строго зависела от значения pH (рисунок 1). Показано, что на ранних стадиях прорастания (однодневные проростки) наблюдается три пика активности липоксигеназ с различными оптимумами pH (5,5; 7,5 и 9,0). При этом максимальная активность липоксигеназ наблюдалась в кислом значении pH (5,0-5,5).

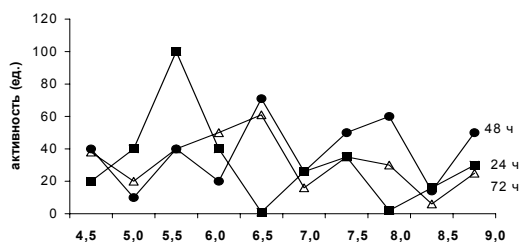


Рисунок 1 - Изменение активности липоксигеназ в ходе прорастания зерна пшеницы

В двухдневных проростках (48 ч) выявлено 4 пика с активностью липоксигеназ (pH оптимум: 4,5; 5,5; 6,5; 8,0 ; 9,0). Наибольшая активность проявлялась в нейтральном и щелочном значении pH. При этом дальнейшее увеличение срока прорастания зерна сопровождалось с существенным снижением кислых форм фермента (pH 5,0-5,5) и увеличением активности нейтральных форм фермента.

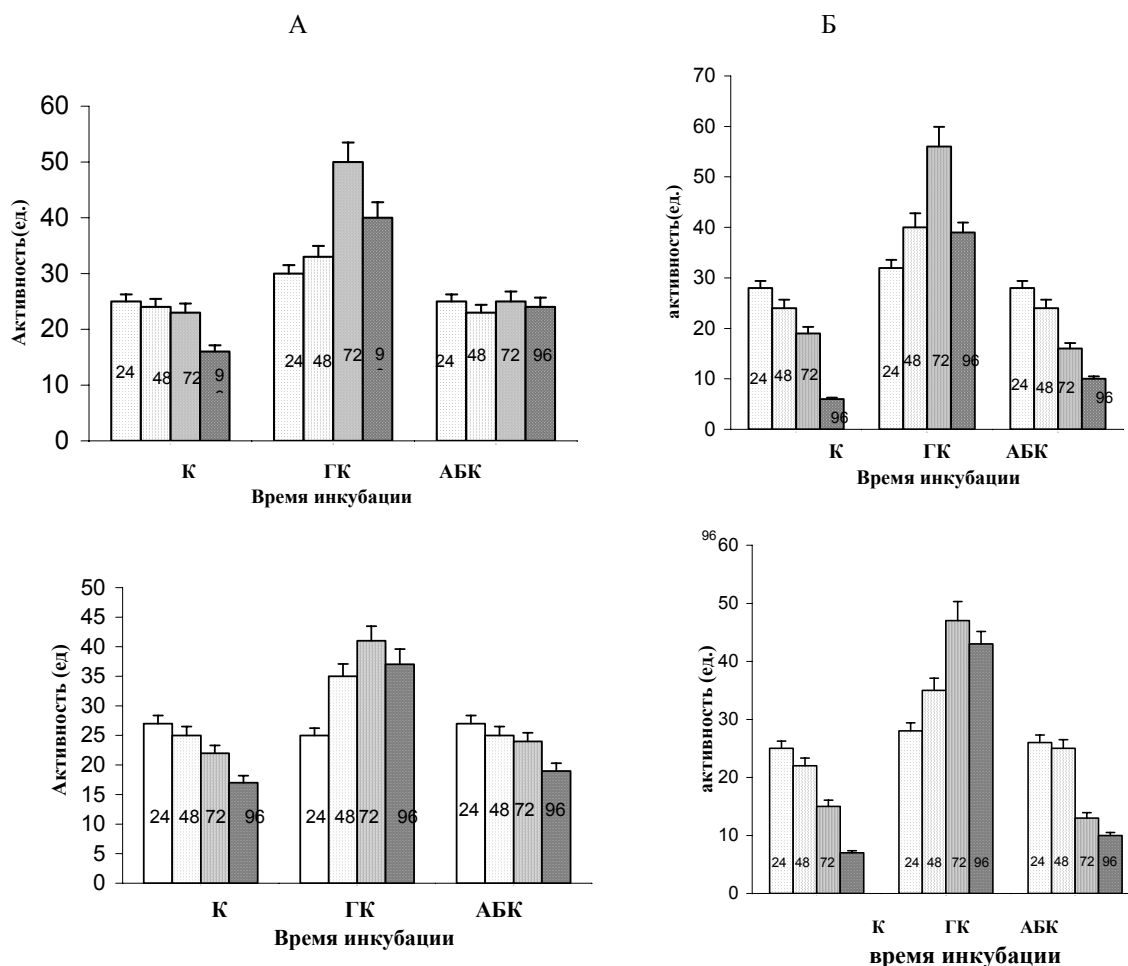


Рисунок 2 - Действие ГК и АБК на активность липоксигеназ алейронового слоя зерна пшеницы в зависимости времени инкубации

Таким образом, в ходе прорастания зерна пшеницы выявлено четыре типа липоксигеназ. Эти типы липоксигеназ различаются по каталитическому pH оптимуму и по характеру активации в ходе прорастания зерна пшеницы. Эти формы липоксигеназ нами разделены на 4 формы на основании оптимума pH. Оптимум

каталитической активности первой группы ферментов приходится на рН 4,5 - 5,5, второй - 6,0-6,5, третьей - 7,5-8,0 и последней – рН 9,0.

Показано, что на начальных стадиях прорастания (24 часа) проявляется активность трех форм фермента с оптимумом рН 4,5 - 5,5, 7,5-8,0, 7,5-8,0 соответственно. При этом максимальную активность, на этой стадии прорастания, проявляет форма фермента с оптимумом в кислых рН (3 раза больше по сравнению с другими формами фермента). Через 2 суток прорастания наблюдается активация нейтральных и щелочных форм фермента, на фоне уменьшения активности кислой формы липоксигеназы. На третий день прорастания наибольшую долю активности, составляет форма фермента с нейтральным значением рН.

Клетки алейронового слоя зерна злаковых содержат большие количества нейтральных липидов в олеосомах и приблизительно 25-30 % объема клеток заняты олеосомами [5]. Наблюдаемая вышеприведенных экспериментах активация липоксигеназ может указывать на интенсивное протекание процессов липогенеза в ходе прорастания зерна. Можно предположить, что на ранних этапах прорастания зерна, клетки алейронового слоя удовлетворяют свои энергетические потребности за счет сахаров образуемых через бетта-окисление липидов и глиоксалатный цикл из за ограниченного доступа к огромным запасам углеводов в крахмальном эндосперме. Побочным продуктом этих реакций – является синтез  $H_2O_2$ . В этом контексте интересно отметить, что липоксигеназы являются самым обильным ферментом в олеосомах злаковых.

Липоксигеназы обнаружены в вегетативных частях, плодах (соя, пшеница, горох, томаты и др.) и клубнях (картофель) растений. Локализованы преимущественно в водной фазе цитоплазмы (цитозоле) клеток. Предполагают, что некоторые липоксигеназы могут существовать в мембраносвязанной форме. Молекула липоксигеназы у животных и некоторых растений состоит из одной полипептидной цепи. Содержит в активном центре ион негемового  $Fe^{3+}$  (восстановленная форма липоксигеназы - неактивна). У растений оптимальная каталитическая активность фермента при рН 6-7 или 9-10, у животных - при рН 7,4-7,8.

В последующих экспериментах мы изучали влияние ГК и АБК на динамику изменения активности изоформ липоксигеназ ( с разными оптимальными значениями рН) в алейроновом слое зерна пшеницы в зависимости от времени инкубации (рисунок 2).

Как показали полученные нами данные (рисунок 2), в контрольных вариантах активность липоксигеназ снижалась в зависимости от времени инкубации, достигая к 96 часам инкубации 60% от исходного (24 часа). Инкубации изолированного алейронового слоя в присутствии ГК в дозе 1мкМ в течение 48 часов, приводило к существенному увеличению активности всех форм липоксигеназ в ткани по сравнению с контролем (рисунок 2). Внесение в среду инкубации АБК (5мкМ) значительно снижало активность липоксигеназ. При этом эффект АБК усиливался по мере увеличения времени инкубации.

Таким образом, анализ представленных результатов показывает, что действие ГК в алейроновом слое зерна пшеницы направлено на активацию клеточных липоксигеназ. Активность липоксигеназ алейронового слоя зерна пшеницы проявляется в достаточно широком диапазоне рН (от 4,5 до 9,0). Это свидетельствует о том, что в клетках алейронового слоя представлены различные формы одного и того же фермента с разным оптимумом рН. Под действием ГК активация всех форм фермента происходит сходным образом. Действие АБК в данной модельной системе направлено, наоборот, на подавление активности липоксигеназ.

Известно, что липоксигеназа - фермент, окисляющий липиды, содержащие цис-цис-диеновые единицы. Образование под влиянием липоксигеназы свободного радикала обуславливает перестройку всей молекулы жирной кислоты. Образующиеся при этом перекиси и гидроперекиси разлагаются до отдельных фрагментов - жирного альдегида, малонового диальдегида, полуальдегида дикарбоновой кислоты. При этом имеется прямая зависимость количества образовавшегося малонового диальдегида от количества двойных связей в молекуле ненасыщенной жирной кислоты. Показано, что содержание малонового диальдегида (МДА) свидетельствует о поражении мембранных липидов в результате их перекисного окисления активными формами кислорода и/или липоксигеназами.

Существует ли корреляция между активностью липоксигеназ и генерацией МДА в клетках алейронового слоя зерна пшеницы? Для выяснения этого вопроса нами был проведен анализ влияния фитогормонов (ГК и АБК) на генерацию МДА в зависимости от времени инкубации.

Как видно из приведенных данных на рисунке 3, присутствие в среде инкубации ГК в дозе 1мкМ в течение 48 часов существенно увеличивало генерацию МДА (на 33%) по сравнению с контролем. Однако дальнейшее увеличение времени инкубации в присутствии ГК приводило к незначительному снижению концентрации МДА в клетках алейронового слоя по сравнению с предыдущими условиями эксперимента. Эти эффекты ГК полностью блокировалось при внесении в инкубационную среду АБК в дозе 5 мкМ.

Установлена строгая корреляция между сроком наступления программированной гибели клеток алейронового слоя [5], генерацией активных форм кислорода, накоплением МДА и изменением активности антиоксидантных ферментов [6]. На основании полученных данных высказано предположение о важной роли активных форм кислорода и антиоксидантных ферментов в реализации фитогормон - регулируемой программированной гибели клеток алейронового слоя зерна пшеницы.

Можно предположить, что в данной модельной системе система антиоксидантов, тормозящих перекисное окисление, в норме (или в присутствии АБК) успешно справляются с " перекисной опасностью", но нарушение какого-либо звена в этих защитных системах ведет к повреждению мембран и возможно к гибели клеток.