

УДК 598.115.33:615.919

ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕАКЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ДЕЙСТВИЕ ЯДОВИТОГО СЕКРЕТА ГАДЮК ВОЛЖСКОГО БАССЕЙНА

© 2019 А.Л. Маленёв, Р.А. Горелов, Т.Н. Атышева

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти (Россия)

Поступила 05.04.2019 г.

В публикации приведены результаты определения токсичности ядовитого секрета гадюк – обыкновенной *Vipera berus* и восточной степной *V. r. renardi*, населяющих бассейн Волги, на двух видах прямокрылых насекомых (банановые *Gryllus assimilis* и домовые сверчки *Acheta domesticus*) и двух видах земноводных (сеголетки озерной *Pelophylax ridibundus* и травяной *Rana temporaria* лягушек). Значения ЛД₅₀ яда восточных степных гадюк *V. r. renardi*, определенные на двух видах сверчков, статистически значимо не различались ($t_{\phi}=0,501$; $P>0,05$): ЛД₅₀ яда для банановых сверчков составила $22,4\pm 3,05$ мкг/г, для домовых – $20,1\pm 3,44$ мкг/г. Это свидетельствует об одинаковой устойчивости сверчков к ядовитому секрету и отсутствии видоспецифичности в их реакции. Видоспецифичность реакции двух видов лягушек при действии образцов ядовитого секрета *V. b. berus* (г. Самара), *V. b. nikolskii* (Липецкая область), *V. r. renardi* (Волгоградская область), *V. r. bashkirovi* (о. Спасский Республики Татарстан) также не выявлена. На образцах ядовитого секрета обыкновенных гадюк из Новгородской области и Пермского края обнаружены видовые различия в устойчивости земноводных к яду. Для яда *V. b. berus* из Новгородской области среднесмертельные дозы составляют $46,3\pm 4,34$ мкг/г (озерные лягушки) и $89,4\pm 9,82$ мкг/г (травяные лягушки); значения ЛД₅₀ яда *V. b. berus* из Пермского края определены как $30,8\pm 2,85$ мкг/г (озерные лягушки) и $95,4\pm 11,39$ мкг/г (травяные лягушки). Для обоих этих образцов ядовитого секрета межвидовые различия в устойчивости лягушек являются статистически значимыми, что говорит о видоспецифичности в реакции лягушек на яд гадюк из этих мест обитания.

Ключевые слова: змеиные яды, среднесмертельная доза ЛД₅₀, сверчки, лягушки.

Malenyov A.L., Gorelov R.A., Atyasheva T.N. The specificity of the response of the experimental animals to the action of the viper's venom from the Volga river basin. – The publication presents the results of determining the viper's venom toxicity – common adder *Vipera berus* and eastern steppe viper *V. r. renardi*, inhabiting the Volga basin, on two species of orthoptera insects (banana crickets *Gryllus assimilis* and house crickets *Acheta domesticus*) and two species of amphibians (fingerlings of lake frogs *Pelophylax ridibundus* and grass frogs *Rana temporaria*). DL₅₀ values of the eastern steppe viper *V. r. renardi* venom, determined on two types of crickets, were not significantly different ($t_{\phi}=0,501$; $P>0,05$): DL₅₀ for banana crickets was $22,4\pm 3,05$ µg/g, for house crickets – $20,1\pm 3,44$ µg/g. This indicates the identical resistance of crickets to viper's venom and the absence of species-specificity in their reaction. Species specificity of the reaction of two species of frogs under the action of venom samples of *V. b. berus* (Samara region), *V. b. nikolskii* (Lipetsk region), *V. r. renardi* (Volgograd region), *V. r. bashkirovi* (Spassky island of Tatarstan Republic) is also not identified. Species differences in the resistance of amphibians were found on venom samples of common adders from the Novgorod and the Perm regions. For *V. b. berus* venom from the Novgorod region, the average lethal doses are $46,3\pm 4,34$ µg/g (lake frogs) and $89,4\pm 9,82$ µg/g (grass frogs); DL₅₀ values of *V. b. berus* venom from the Perm region is defined as $30,8\pm 2,85$ µg/g (lake frogs) and $95,4\pm 11,39$ µg/g (grass frogs). For both of these venom samples, interspecific differences in the stability of frogs are statistically significant, which indicates the species specificity in the frog's reaction to the venom from these habitats.

Key words: snake venoms, average lethal dose DL₅₀, crickets, frogs.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что змеиный яд по-разному действует на животных разных систематических групп (Орлов и др., 1985; Гелашвили и др., 2015). Эффект воздействия яда на организм экспериментальных животных зависит от многих факторов – с одной стороны, от состава и механизма действия самого ядовитого секрета, с другой – определяется устойчивостью тех или иных видов экспериментальных животных. Наибольший интерес и практическое значение имеют результаты определения токсичности змеиных ядов на тех видах животных, которые в природных условиях являются добычей ядовитых змей. В частности, основные компоненты рациона обыкновенных и восточных степных гадюк, встречающихся в бассейне Волги, – это мышевидные грызуны, прямокрылые насекомые, земноводные и ящерицы (Бакиев и др., 2015). В опубликованных ранее работах нами была рассмотрена токсичность ядов гадюк для этих пищевых объектов (Маленёв и др., 2013, 2016; Горелов и др., 2016; Шитиков и др., 2018). В этих работах проведен сравнительный анализ токсичности разных подвидов гадюк на одном из их пищевых объектов и были рассмотрены подвидовые, географические, сезонные, половые и возрастные особенности токсичности их ядовитого секрета. При этом сравнения среднесмертельных доз ядовитого секрета гадюк на близких видах пищевых объектов проведено не было. Поэтому цель настоящего исследования – выявить возможные видоспецифические особенности в реакции близких видов экспериментальных животных на ядовитый секрет гадюк.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы ядовитого секрета. Объединенные образцы ядовитого секрета гадюк были получены в течение полевых сезонов 2013–2017 гг. Каждый объединенный образец представлял собой яд, собранный от взрослых гадюк разного пола и разных размеров, но отловленных в одном месте и в одно и то же время (табл. 1). Ядовитый секрет у гадюк отбирали в лаборатории механическим способом, массируя ядовитые железы, в стеклянные чашки Петри с последующим высушиванием в эксикаторе над

Маленёв Андрей Львович, к.б.н., заведующий лабораторией герпетологии и токсикологии, malenyov@mail.ru; Горелов Роман Андреевич, к.б.н., мл. научный сотрудник той же лаборатории, gorelov.roman@mail.ru; Атяшева Татьяна Николаевна, инженер-исследователь той же лаборатории, tatyana.atyasheva@mail.ru

хлористым кальцием в течение 12-14 суток при комнатной температуре. Образцы хранили в полипропиленовых микропробирках при температуре +5...+6 °С и в темноте (Яд гадюки..., 1998а, 1998б). После отбора яда и морфологических измерений гадюк выпускали в места их отлова.

Сверчки. Сверчков содержали и разводили в лабораторных условиях (Маленёв и др., 2016). В опытах по определению ЛД₅₀ яда восточных степных гадюк *V. r. renardi* использовали сверчков двух видов – банановых *Gryllus assimilis* и домовых *Acheta domesticus*, но одинаковой массы – 0,3-0,4 г и без разделения на самцов и самок. Сверчков каждого вида разбили на 7 опытных групп по 10 насекомых и на каждой группе протестировали 1 дозу яда. Диапазон тестируемых доз: 2-5-10-20-30-40-50 мкг/г веса насекомых. Водный раствор яда в концентрации 2,0 мг/мл вводили сверчкам микрошприцом внутривентально в правую нижнюю четверть брюшка с дорзальной стороны.

Лягушки. В каждом объединенном образце ядовитого секрета исследуемых подвидов гадюк (*V. b. berus*, *V. b. nikolskii*, *V. r. renardi*, *V. r. bashkirovi*) мы определили среднесмертельную дозу ЛД₅₀ на обоих видах земноводных. В опытах использовали сеголетков двух видов лягушек – озерной *Pelophylax ridibundus* массой 2,0-3,5 г, отловленных в пойме р. Ахтуба (Красноярский район Астраханской области), и травяной *Rana temporaria* массой 1,5-3,0 г, отловленных в Раменском районе Московской области.

Токсикометрия. Концентрации водных растворов ядовитого секрета гадюк и диапазон анализируемых на лягушках доз приведены в табл. 2 – их подбирали эмпирически с учетом полученных ранее результатов (Маленёв и др., 2013).

При определении ЛД₅₀ растворов каждого образца ядовитого секрета на озерных лягушках анализировали 6 доз яда по 5 лягушек для каждой дозы. На травяных лягушках для анализа ядовитого секрета *V. b. berus* использовали 6 доз яда по 6 лягушек в каждой, а при тестировании образцов ядов *V. b. nikolskii*, *V. r. renardi* и *V. r. bashkirovi* применили 5 доз по 6 лягушек. Водные растворы яда вводили лягушкам внутривентально в правую нижнюю четверть брюшка с вентральной стороны.

Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–25°С). Наблюдения за животными прекращали через 24 часа после инъекции яда, подсчитывали число погибших и выживших животных и рассчитывали среднесмертельные дозы ЛД₅₀ методом модифициро-

Таблица 1

Характеристика гадюк, от которых получен ядовитый секрет

Гадюки	Место отлова	n
<i>V. b. berus</i>	г. Самара, Красноглинский р-н	>60
	Новгородская обл., Боровичский р-н, окрестности с. Опеченский посад	24
	Пермский край, Чердынский р-н, окрестности пос. Чепец	36
<i>V. b. nikolskii</i>	Липецкая обл., Добровский р-н, Кривецкое лесничество	15
<i>V. r. renardi</i>	Волгоградская обл., Камышинский р-н, окрестности с. Верхняя Добринка	20
<i>V. r. bashkirovi</i>	Республика Татарстан, Спасский р-н, о. Спасский	16

Примечание: n – количество отловленных гадюк, от которых был получен ядовитый секрет.

Таблица 2

Концентрации водных растворов яда гадюк и диапазон анализируемых доз на сеголетках лягушек

Подвиды гадюк	Место отлова гадюк	Озерные лягушки		Травяные лягушки	
		Яд, мг/мл	Дозы, мкг/г	Яд, мг/мл	Дозы, мкг/г
<i>V. b. berus</i>	г. Самара	5,0	5-10-20-40-60-80	5,0	10-20-30-40-60-80
	Новгородская обл.	5,0	5-10-20-40-60-80	8,0	20-40-60-80-100-150
	Пермский край	5,0	5-10-20-40-60-80	8,0	20-40-60-80-100-150
<i>V. b. nikolskii</i>	Липецкая обл.	2,0	3-6-9-12-15-20	1,0	2-5-10-20-30
<i>V. r. renardi</i>	Волгоградская обл.	2,0	3-6-9-12-15-20	3,0	5-10-20-30-40
<i>V. r. bashkirovi</i>	Республика Татарстан	2,0	3-6-9-12-15-20	3,0	5-10-20-30-40

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку прямокрылые насекомые являются значительной частью рациона восточных степных гадюк (Бакиев и др., 2008а, 2015), мы определили токсичность яда *V. r. renardi* на двух видах сверчков – банановых *Gryllus assimilis* и домашних *Acheta domesticus*. Известно, что банановые сверчки на стадии имаго более чем в 2 раза крупнее домашних, поэтому в опытах мы использовали крупных домашних сверчков и мелких банановых, но всех нормировали по массе: в экспериментальные группы отбирали сверчков обоих видов на стадии предимаго одинаковой массы 0,3-0,4 г. В группах присутствовали самцы и самки сверчков, т.к. ранее мы установили, что самцы и самки сверчков обладают одинаковой устойчивостью к яду восточной степной гадюки (Маленёв и др., 2016).

В этих экспериментах по определению ЛД₅₀ использовали один и тот же образец ядовитого секрета восточных степных гадюк *V. renardi* из Волгоградской области (Камышинский район, окрестности с. Верхняя Добринка), но на разных видах сверчков. Для банановых сверчков ЛД₅₀ определена нами как 22,4±3,05 мкг/г, а для домашних – 20,1±3,44 мкг/г. Значения ЛД₅₀, определенные на разных видах сверчков одинаковой массы, статистически значимо не различаются ($t_{\phi} = 0,501$; $P > 0,05$). На наш взгляд,

это свидетельствует в пользу одинаковой устойчивости сверчков и отсутствия видоспецифических особенностей в реакции этих видов сверчков на яд восточной степной гадюки.

В то же время, полученные ранее результаты определения токсичности того же образца *V. r. renardi* на двух видах ящериц показали существенные различия в ЛД₅₀: яд оказался токсичнее для разноцветных ящурок (ЛД₅₀=9,9±5,75 мкг/г), чем для прытких ящериц (ЛД₅₀=261,0±44,40 мкг/г) (Горелов и др., 2016). Поскольку разноцветные ящурки в экспериментах были представлены взрослыми особями, а прыткие ящерицы – сеголетками, окончательные выводы о межвидовых различиях будут преждевременными без исследования возрастных изменений в устойчивости ящериц к яду. Тем не менее, в этом случае наблюдается видоспецифичность реакции двух видов ящериц на один и тот же образец ядовитого секрета, которая, скорее всего, определяется разной устойчивостью этих видов ящериц.

Аналогичным образом мы определили ЛД₅₀ ядов четырех подвидов гадюк (*V. b. berus*, *V. b. nikolskii*, *V. r. renardi* и *V. r. bashkirovi*) на сеголетках двух видов лягушек – озерной *Pelophylax ridibundus* и травяной *Rana temporaria*. Известно, что земноводные являются компонентом питания обыкновенной гадюки, а в северных частях ареала они составляют значитель-

ную часть рациона (Bakiev u.a., 2005; Коросов, 2010; Бакиев и др., 2008б, 2015). Именно по этой причине мы выбрали для анализа яд *V. b. berus*, полученный от гадюк из разных мест

обитания (г. Самара, Новгородская область и Пермский край). Результаты определения ЛД₅₀ ядов гадюк представлены на диаграммах (рисунок).

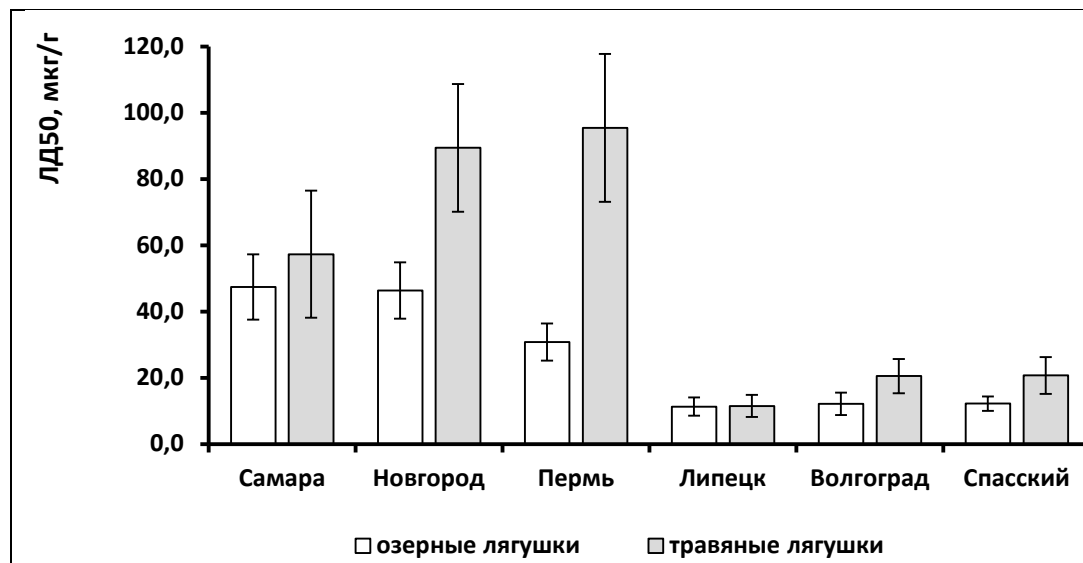


Рис. Значения ЛД₅₀ ядов исследованных подвидов гадюк для сеголетков озерных и травяных лягушек

(средние значения среднесмертельных доз и доверительные интервалы на 95%-ном уровне значимости). Обозначение образцов ядов разных подвидов с учетом локалитетов отлова гадюк приведены в табл. 1

Как видно из представленных диаграмм, устойчивость двух видов лягушек к ядам *V. b. nikolskii* (Липецкая обл.), *V. r. renardi* (Волгоградская область) и *V. r. bashkirovi* (о. Спасский) оказалась практически одинаковой, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий между значениями ЛД₅₀, полученными для одного и того же образца, но на разных видах земноводных (доверительные интервалы средних значений перекрываются).

При определении ЛД₅₀ яда гадюк *V. b. berus* из разных мест обитания мы получили следующую картину. Среднесмертельные дозы яда *V. b. berus*, определенные на травяных лягушках, имеют большее абсолютное значение, чем таковые, полученные на озерных (см. рисунок).

Для образца ядовитого секрета гадюк из г. Самара мы не выявили статистически значимых различий в ЛД₅₀ для двух видов земноводных. В то же время, токсичность яда гадюк из Новгородской области и Пермского края, определенная на разных видах лягушек, оказалась различной. Эти межвидовые различия в ЛД₅₀ оказались статистически значимыми – как для яда гадюк из Новгородской области ($t_{\phi}=3,76$; $P<0,001$), так и для ядовитого секрета гадюк из Пермского края ($t_{\phi}=5,06$; $P<0,001$). Мы считаем, что это говорит, во-первых, о том, что реакция разных видов лягушек на эти образцы яда является видоспецифичной, и во-вторых, меньшие абсолютные значения ЛД₅₀ для озер-

ных лягушек свидетельствуют, скорее всего, об их большей устойчивости к яду.

Тот факт, что яд обыкновенных гадюк из разных мест обитания в пределах Волжского бассейна для озерных лягушек имеет разные значения ЛД₅₀, был установлен нами ранее (Маленёв и др., 2013). По результатам анализа большого числа образцов яда обыкновенных гадюк из бассейна Волги (республики Татарстан, Мордовия, Чувашия, Самарская, Новгородская, Нижегородская, Московская области и Пермский край) был определен диапазон значений ЛД₅₀. Наибольшей токсичностью отличался яд гадюк из Пермского края (ЛД₅₀=30,6±1,96 мкг/г), наименее токсичным оказался яд гадюк из Республики Татарстан (ЛД₅₀=51,9±4,43 мкг/г). Из этих данных следует, что ядовитый секрет гадюк из северо-западных (Московская, Новгородская и Нижегородская области) и северо-восточных регионов (Пермский край) Волжского бассейна более токсичен по сравнению с таковым гадюк из региона Средней Волги (Самарская область, Республики Татарстан, Чувашия, Мордовия). Для травяных лягушек мы получили иную картину – яд обыкновенных гадюк из Новгородской области и Пермского края оказался менее токсичным, чем таковой из Самарской области. Причины этого объяснить мы пока не можем, потому что полученные ранее результаты говорят о схожести биохимических параметров и пеп-

тидного состава этих образцов ядовитого секрета (Зайцева, 2011).

В той же работе (Маленёв и др., 2013) мы отметили, что яд *V. b. nikolskii* для озерных лягушек более токсичен, чем яд *V. b. berus*. Аналогичную закономерность мы выявили теперь и на травяных лягушках (рис.). Различия в токсичности ядов *V. b. berus* и *V. b. nikolskii* для амфибий нельзя объяснить только пищевыми предпочтениями двух подвидов гадюк, поскольку земноводные в рационе гадюки Никольского являются скорее исключением, чем правилом. Вполне вероятно, что причиной этих различий могут быть отличия в структуре и механизмах действия самого ядовитого секрета. В яде *V. b. nikolskii* были обнаружены две гетеродимерные фосфолипазы A_2 (HDP-1 и HDP-2), которых нет в ядовитом секрете *V. b. berus* (Ramazanova et al., 2008; Рамазанова, 2011). Каждая фосфолипаза A_2 состоит из мономерных субъединиц – гидрофобной щелочной энзиматической субъединицы HDP-1P (13798 кДа) и HDP-2P (13827 кДа) и кислой субъединицы HDP-In, лишённой ферментативной активности. Исследование биологической активности этих фосфолипаз A_2 показало наличие у них нейротоксической активности – на нервно-мышечную передачу у лягушки эти белки ока-

зывают действие, типичное для пресинаптических нейротоксичных фосфолипаз A_2 .

Ранее мы установили, что и для мышей яд *V. b. nikolskii* более токсичен, чем ядовитый секрет *V. b. berus* (Шитиков и др., 2018). Скорее всего, за счет этих активных фосфолипаз A_2 яд гадюки Никольского обладает нейротоксическим эффектом, и наличие этих специфичных белковых компонентов может обуславливать более высокую (по сравнению с *V. b. berus*) токсичность яда для позвоночных животных – как для лягушек, так и для мышей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов говорят о следующем. На образцах ядовитого секрета *V. b. nikolskii*, *V. r. renardi*, *V. r. bashkirovi* и *V. b. berus* (из г. Самара) мы не выявили какой-либо видоспецифичности в реакции травяных лягушек по сравнению с озерными. В то же время на образцах яда *V. b. berus* из Новгородской области и Пермского края обнаружены статистически значимые различия в LD_{50} – токсичность этих образцов статистически значимо выше для озерных лягушек. Это может свидетельствовать о разной устойчивости двух видов земноводных к действию именно этих образцов ядовитого секрета и (или) видоспецифичности их реакций на яд.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелашвили Д.Б. и др.** Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: *Vipera*) Волжского бассейна. Часть 1. Тольятти: Кассандра, 2015. 234 с.
- Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Павлов А.В., Шуршина И.В., Маленев А.Л.** Восточная степная гадюка *Vipera renardi* (Reptilia, Viperidae) в Волжском бассейне: материалы по биологии, экологии и токсинологии // Бюл. «Самарская Лука». 2008а. Т. 17, № 4. С. 817-845.
- Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Четанов Н.А., Зайцева О.В., Песков А.Н.** Обыкновенная гадюка *Vipera berus* (Reptilia, Viperidae) в Волжском бассейне: материалы по биологии, экологии и токсинологии // Бюл. «Самарская Лука». 2008б. Т. 17, № 4. С. 759-816.
- Беленький М.Л.** Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963. 152 с.
- Гелашвили Д.Б., Крылов В.Н., Романова Е.Б.** Зоотоксикология: биоэкологические и биомедицинские аспекты. Учебное пособие. Нижний Новгород: Изд-во ННГУ, 2015. 770 с.
- Горелов Р.А., Маленёв А.Л., Атяшева Т.Н., Гордеев Д.А., Прилипко С.К.** Токсичность ядовитого секрета гадюк *Vipera renardi* и *V. berus* для ящериц // Изв. Самар. НЦ РАН. 2016. Т. 18, № 5 (3). С. 415-418.
- Зайцева О.В.** Популяционные особенности ядовитого секрета обыкновенной гадюки *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) в Волжском бассейне: дис. ... канд. биол. наук. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2011. 108 с.
- Коросов А.В.** Экология обыкновенной гадюки (*Vipera berus* L.) на Севере (факты и модели). Петрозаводск: Изд-во Петрозаводского государственного университета, 2010. 264 с.
- Маленёв А.Л., Горелов Р.А., Атяшева Т.Н., Бакиев А.Г.** Острая токсичность яда восточной степной гадюки для сверчков: некоторые результаты, имеющие практическое значение // Изв. Самар. НЦ РАН. 2016. Т. 18, № 5. С. 118-121.
- Маленёв А.Л., Горелов Р.А., Бакиев А.Г.** Токсичность яда обыкновенной гадюки *Vipera berus* для озерных лягушек *Pelophylax ridibundus* // Изв. Самар. НЦ РАН. 2013. Т. 15, № 3 (7). С. 2337-2340.
- Орлов Б.Н., Гелашвили Д.Б., Ибрагимов А.К.** Ядовитые животные и растения СССР. М.: Высш. шк., 1990. 272 с.
- Рамазанова А.С.** Структурно-функциональные исследования новых токсичных белков яда гадюки *Vipera nikolskii*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2011. 23 с.
- Шитиков В.К., Маленёв А.Л., Горелов Р.А., Бакиев А.Г.** Модели «доза-эффект» со смешанными параметрами на примере оценки токсичности яда обыкновенной гадюки *Vipera berus* // Принципы

экологии 2018. № 2. С. 150-160. DOI: 10.15393/j1.art.2018.7542.

Яд гадюки обыкновенной сухой. Временная фармакопейная статья: ВФС 42-3026-98. М., 1998а. 23 с.

Яд гадюки степной сухой. Временная фармакопейная статья: ВФС 42-3025-98. М., 1998б. 23 с.

Bakiev A.G., Böhme W., Joger U. *Vipera (Pelias) [berus] nikolskii* Vedmederya, Grubant und Rudaeva,

1986 – Waldsteppenotter // Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/IIb: Schlangen (Serpentes) III. Viperidae. Wiebelsheim: AULA-Verlag, 2005. S. 293-309.

Ramazanova A.S., Zavada L.L., Starkov V.G. et al. Heterodimeric neurotoxic phospholipases A₂ – The first proteins from venom of recently established species *Vipera nikolskii*: Implication of venom composition in viper systematics // Toxicon. 2008. V. 51. P. 524-537.