

УДК 598.115.33:615.919

СРЕДНЕСМЕРТЕЛЬНЫЕ ДОЗЫ ЛД₅₀ ЯДОВИТОГО СЕКРЕТА ГАДЮК И МАССА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2019 **А.Л. Маленёв**, Р.А. Горелов, Т.Н. Атяшева

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

Поступила 20.03.2019

В статье приведены результаты определения среднесмертельных доз ЛД₅₀ ядовитого секрета обыкновенной *Vipera berus* и восточной степной *V. renardi* гадюк на разных экспериментальных животных, являющихся в природе их пищевыми объектами (прямокрылые насекомые, земноводные, мышевидные грызуны). Установлены значения ЛД₅₀ для яда *V. renardi* на банановых сверчках разной массы, ядовитого секрета *V. renardi* и *V. berus* на сеголетках озерной лягушки разных весовых групп и яда *V. berus* для самцов и самок мышей разной массы. Для исследованных видов животных и яда обоих видов гадюк отмечена общая тенденция снижения значений ЛД₅₀ при увеличении массы экспериментальных животных. При этом на имеющемся экспериментальном материале статистически значимых различий в значениях ЛД₅₀, определенных на животных одного вида разной массы, выявить не удалось.

Ключевые слова: обыкновенная гадюка *Vipera berus*, восточная степная гадюка *Vipera renardi*, ядовитый секрет, среднесмертельная доза ЛД₅₀, мыши, лягушки, сверчки.

Malenyov A.L., Gorelov R.A., Atyasheva T.N. Half-lethal doses DL₅₀ of a viper's venoms and mass of the experimental animals. – The article presents the results of determining the half-lethal doses (DL₅₀) of the snake venoms of common adders *Vipera berus* and eastern steppe vipers *V. renardi* on various animals that are in nature their food objects (insects, amphibians, mouse-like rodents). The DL₅₀ values for *V. renardi* venom on banana crickets of different mass, venoms of *V. renardi* and *V. berus* on lake frog fingerlings of different body weight and *V. berus* venom for male and female mice of different mass were established. For the studied species of animals and the venoms of both species of vipers, there is a general tendency for the DL₅₀ values to decrease with increasing mass of experimental animals. At the same time on the available experimental material statistically significant differences in the values of DL₅₀, determined on animals of the same species but different mass, could not be identified.

Key words: common adder *Vipera berus*, eastern steppe viper *Vipera renardi*, snake venom, half-lethal dose DL₅₀, crickets, frogs, mice.

ВВЕДЕНИЕ

Определение среднесмертельной дозы ЛД₅₀ ядовитых веществ (в том числе и ядовитого секрета змей) предполагает построение зависимости эффекта воздействия яда (летальности экспериментальных животных) от количества

вводимого ядовитого секрета (Беленький, 1963). ЛД₅₀, выраженная в мкг/г (или мг/кг), отражает ту дозу яда, при которой наблюдается гибель 50% экспериментальных животных. Определение ЛД₅₀ яда гадюк в «классическом» варианте предполагает инъекцию раствора ядовитого секрета в возрастающих дозах экспериментальным животным одинаковой массы, сформированным в группы, и на каждой группе животных анализируют одну дозу яда (Гелашвили и др., 2015). В токсикологическом эксперименте по определению ЛД₅₀ необходимо использовать животных одинаковой массы, одного пола, содержащихся в одинаковых усло-

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

виях (режим кормления, температура и т.п.). В частности, в экспериментах на мышах рекомендовано использовать мышей-самцов массой 20,0±1,0 г. При таком подходе сводятся к минимуму и половые различия, и различия, обусловленные онтогенетическими особенностями. Ранее было показано на ядовитом секрете четырех подвидов гадюк (*V. b. berus*, *V. b. nikolskii*, *V. r. renardi*, *V. r. bashkirovi*), что в наших экспериментальных условиях самцы и самки мышей обладают одинаковой устойчивостью к их яду (Горелов, 2018). Значения ЛД₅₀ яда восточных степных гадюк, определенные на самцах и самках банановых сверчков, также не имеют статистически значимых различий (Маленёв и др., 2016). Поэтому цель настоящего исследования – выявить возможную зависимость значений ЛД₅₀ ядов обыкновенной и восточной степной гадюк от массы экспериментальных животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ядовитый секрет гадюк. Объединенные образцы ядовитого секрета обыкновенной *V. berus* и восточной степной *V. renardi* гадюк из разных локалитетов на территории Волжского

бассейна были получены ранее (2013-2017 гг.) в ходе плановых экспедиций. Все процедуры получения ядовитого секрета проводили в лаборатории стандартными методами (Маленёв и др., 2014). Выбор именно этих образцов ядовитого секрета гадюк был обусловлен тем, что их количества было достаточно для проведения серии токсикологических экспериментов.

Сверчки. В экспериментах по определению ЛД₅₀ на насекомых использовали культуру банановых сверчков *Gryllus assimilis*, которых содержали и разводили в лаборатории. В экспериментах использовали водный раствор яда в концентрации 2,0 мг/мл, и определение ЛД₅₀ яда гадюк проводили на группах сверчков массой 0,40-0,49, 0,50-0,59, 0,60-0,69 и 0,70-0,79 г, в которых присутствовали и самцы, и самки сверчков. На каждой весовой группе было проанализировано 6 доз яда (5-10-20-30-40-60 мкг/г) по 5 сверчков для каждой дозы (таблица). Водные растворы яда вводили сверчкам внутрибрюшинно с помощью микрошприца (1-30 мкл) в правую нижнюю четверть брюшка с дорзальной стороны.

Таблица

Характеристика гадюк, от которых получен яд, и экспериментальных животных

Вид гадюк	Место отлова гадюк	Экспериментальные животные	Пол экспериментальных животных	Масса животных в группе, г	n
<i>V. renardi</i>	Волгоградская обл., Камышинский р-н, окрестности с. Верхняя Добринка	банановые сверчки	самцы и самки	0,40-0,49	30
				0,50-0,59	30
				0,60-0,69	30
				0,70-0,79	30
<i>V. berus</i>	Новгородская обл., Боровичский р-н, окрестности с. Опеченский посад	озерные лягушки	самцы и самки	1,6-2,0	30
				2,1-2,5	30
				3,6-4,0	30
<i>V. renardi</i>	Волгоградская обл., Камышинский р-н, окрестности с. Верхняя Добринка			1,6-1,8	25
				2,6-3,0	25
				3,6-4,0	25
<i>V. berus</i>	г. Самара, Красноглинский р-н	лабораторные мыши	самцы	14,0-16,5	12
				19,5-21,0	12
				25,0-29,0	12
			самки	14,0-16,5	12
				19,5-21,0	12
				25,0-29,0	12

Лягушки. Для определения ЛД₅₀ ядов гадюк для земноводных использовали сеголетков озерной лягушки *Pelophylax ridibundus*, которые были отловлены в пойме р. Ахтуба (Красноярский район Астраханской области, окрестности ст. Досанг) в конце августа – начале сентября 2013 г. (Маленёв и др., 2013).

Ядовитый секрет обыкновенных гадюк ана-

лизировали на лягушках трех групп с массой 1,6-2,0 г, 2,0-2,5 г и 3,6-4,0 г. Водный раствор яда использовали в концентрации 5,0 мг/мл, и в каждой весовой группе анализировали 6 доз (5-10-20-40-60-80 мкг/г) по 5 лягушек для каждой дозы (таблица).

Определение ЛД₅₀ яда восточных степных гадюк проводили на лягушках массой 1,6-1,8 г,

2,6-3,0 г и 3,6-4,0 г. В каждой весовой группе было проанализировано 5 доз яда (5-10-15-20-30 мкг/г), также по 5 лягушек (таблица). Водные растворы яда вводили лягушкам внутрибрюшинно в правую нижнюю четверть брюшка с вентральной стороны.

Мыши. Белых лабораторных мышей *Mus musculus* содержали и разводили в виварии в стандартных клетках для мелких грызунов. В экспериментах использовали группы мышей (отдельно самцов и самок) с массами 14,0-16,5, 19,5-21,0 и 25,0-29,0 г. Яд растворяли в физиологическом растворе до концентрации 3,0 мг/мл и анализировали 4 дозы (0,5-1,0-2,0-3,0 мкг/г) по 3 мыши в каждой группе (таблица). Раствор ядовитого секрета вводили мышам также внутрибрюшинно в правую нижнюю четверть брюшка с вентральной стороны.

Токсикометрия. Наблюдения за животными проводили в течение 24 часов после инъекции яда, после чего подсчитывали количество погибших и выживших животных. В качестве

контроля использовали группы животных, которым вместо раствора яда вводили эквивалентный объем дистиллированной воды. В наших экспериментальных условиях все животные контрольных групп оставались живыми в течение времени наблюдения. Эксперименты по токсикометрии проводили при комнатной температуре (22-25°C).

Пробит-анализ. Для каждой весовой группы разных видов экспериментальных животных значение среднесмертельной дозы ЛД₅₀ рассчитывали методом модифицированного пробит-анализа (Безруков и др., 1995) и выражали в мкг яда/г массы тела. Достоинство данного метода заключается в том, что с его помощью можно рассчитать не только среднее значение ЛД₅₀, но и ошибку средней ($M \pm m$), а также провести сравнительный анализ токсичности разных образцов яда. Сравнение значений среднесмертельных доз проводили методами параметрической статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента (Лакин, 1990).

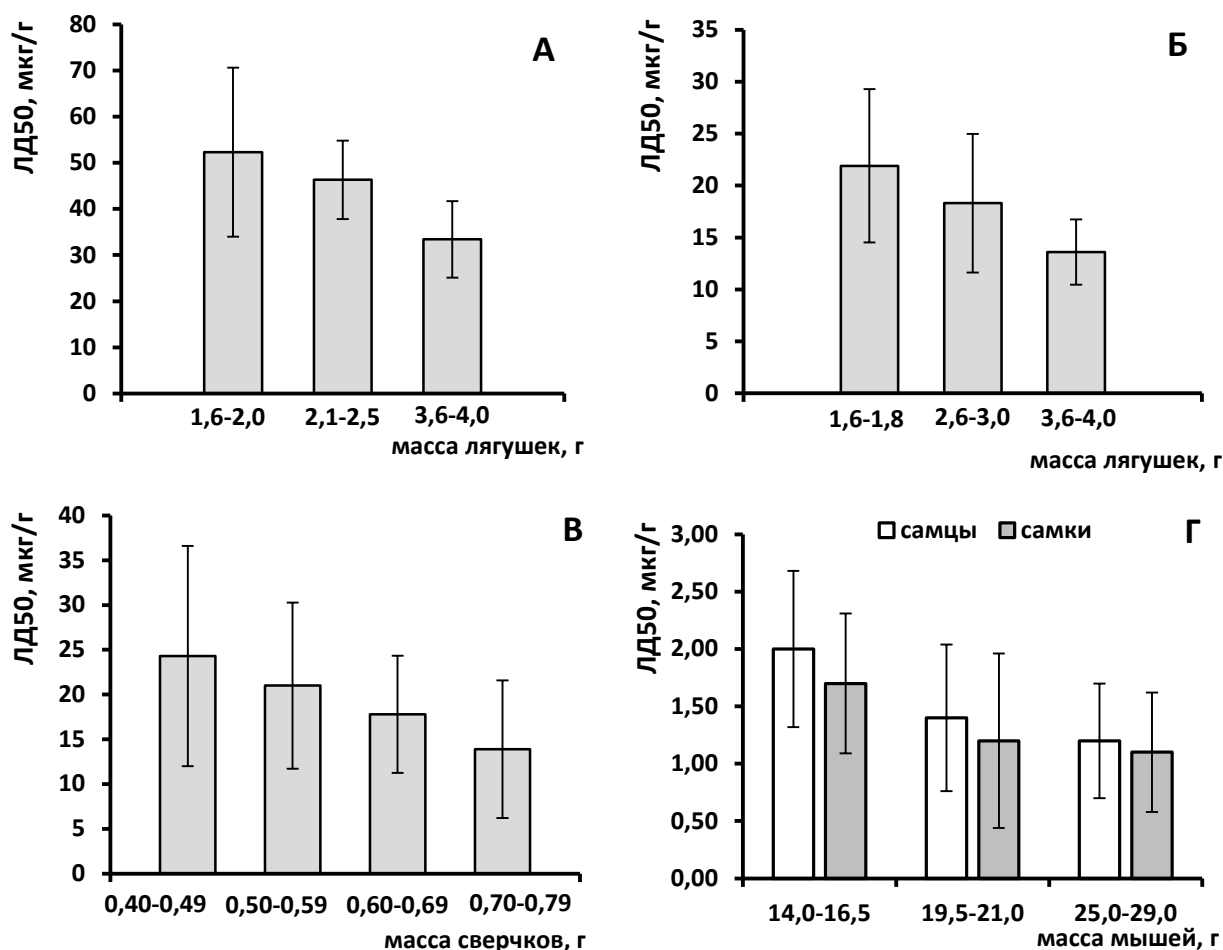


Рис. Значения ЛД₅₀, определенные на экспериментальных животных разной массы (А – сеголетки озерной лягушки, ядовитый секрет *Vipera berus*; Б – сеголетки озерной лягушки, ядовитый секрет *V. renardi*; В – банановые сверчки, ядовитый секрет *V. renardi*; Г – самцы и самки лабораторных мышей, ядовитый секрет *V. berus*)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты определения ЛД₅₀ ядов гадюк на экспериментальных животных разной массы тела представлены на рисунке (А, Б, В, Г). В диаграммах приведены средние значения ЛД₅₀ и их 95%-ные доверительные интервалы. Данные виды экспериментальных животных выбраны по той причине, что в природе они являются пищевыми объектами гадюк – в частности, мышевидные грызуны входят в состав рациона обоих видов гадюк, прямокрылые насекомые составляют значительную часть рациона восточных степных гадюк, а земноводные являются пищевыми объектами обыкновенных гадюк (Bakiev u.a., 2005; Бакиев и др., 2008а, б, 2015).

Как видно из представленных диаграмм, наблюдается общая тенденция – чем больше масса животных в группе, тем меньше абсолютное значение ЛД₅₀, т.е. с увеличением массы животных в группах экспериментально определенные значения ЛД₅₀ снижаются. Это отмечено для ядовитого секрета обоих видов гадюк и трех разных видов экспериментальных животных (рисунок). Но при сравнении значений ЛД₅₀ яда, определенных на животных одного вида разной массы, статистически значимых различий выявить не удалось – отмеченные на диаграмме доверительные интервалы

средних значений ЛД₅₀ перекрываются.

Тем не менее, полученные результаты позволяют сформулировать замечания, которые следует учитывать на практике при планировании и проведении токсикологических экспериментов: увеличение массы животных в испытуемых группах приводит к некоторому занижению значений ЛД₅₀ в опыте, а расширение диапазона масс животных в группах приводит к увеличению ошибки при экспериментальном определении ЛД₅₀.

ВЫВОДЫ

Представленные выше результаты определения среднесмертельных доз ЛД₅₀ ядовитого секрета обыкновенной и восточной степной гадюк свидетельствуют о наличии общей тенденции снижения значений ЛД₅₀ при увеличении массы экспериментальных животных. Данная тенденция отмечена для всех рассмотренных видов экспериментальных животных (сверчки, лягушки, мыши). При этом статистически значимых различий при сравнении величин ЛД₅₀, определенных на животных одного вида разной массы, на имеющемся экспериментальном материале нам выявить не удалось.

Авторы выражают признательность А.Г. Бакиеву и А.А. Клёниной за помощь в сборе материала и консультации.

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 токсикологии // 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 токсикологии // Бюл. «Самарская Лука». 2008б. Т. 17, № 4. С. 759-816.
- Безруков М.Е., Гелашвили Д.Б., Силкин А.А. Методы токсикометрии в биомониторинге // Экологический мониторинг. Методы биомониторинга: Учебное пособие. Часть II. Н. Новгород: Изд-во ННГУ, 1995. 272 с.
- 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. Ядоотдача и токсичность ядовитого секрета гадюк Волжского бассейна: Дис. ... канд. биол. наук. Тольятти: ИЭВБ РАН, 2018. 114 с.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. Учеб. пособие для биол. спец. вузов. 4-е изд., перераб. и доп. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
- Маленёв А.Л., Горелов Р.А., Атяшева Т.Н., Бакиев А.Г. Ядоотдача и свойства ядовитого секрета восточной степной гадюки *Vipera renardi* в разное время сезонной активности // Совр. герпетология. 2016. Т. 16, вып. 3/4. С. 129-134.
- 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.
- Маленёв А.Л., Макарова Т.Н., Горелов Р.А. Особенности ядовитого секрета гадюки Ренара (*Vipera renardi*) из Волгоградской области // Изв. Самар. НЦ РАН. 2014. Т. 16, № 1. С. 261-265.
- Bakiev A.G., Böhme W., Joger U. *Vipera (Pelias) [berus] nikolskii* Vedmederya, Grubant und Rudaeva, 1986 – Waldsteppenotter // Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/1B: Schlangen (Serpentes) III. Viperidae. Wiebelsheim: AULA-Verlag, 2005. S. 293-309.