

## ТОКСИЧНОСТЬ ЯДА ОБЫКНОВЕННЫХ ГАДЮК ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПУНКТОВ АРЕАЛА

© 2007 А.Л. Маленев, А.Г. Бакиев, О.В. Зайцева, И.В. Шуршина

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

В статье приведены результаты токсикометрии (определения среднесмертельной дозы  $LD_{50}$ ) образцов яда обыкновенной гадюки (*Vipera berus*) из различных пунктов ареала (Самарская, Нижегородская, Ульяновская, Пензенская, Саратовская, Пермская и Харьковская области, Республики Татарстан, Мордовия и Чувашия).

### Введение

Проблема вариабельности биологических характеристик змеиных ядов широко изучается во всем мире. Изменчивость свойств ядовитого секрета рассматривается исследователями на разных уровнях, в том числе на межвидовом, внутривидовом и межпопуляционном [9].

Токсичность и ферментативные активности являются основными характеристиками биологической активности ядовитого секрета. Токсичность яда является интегральной характеристикой и отражает общее воздействие токсина на живой организм, тогда как ферменты змеиных ядов имеют конкретные точки приложения и механизмы действия. Экспериментально определенная среднесмертельная доза ( $LD_{50}$ ), т.е. доза токсина, при воздействии которой выживает половина экспериментальных животных, позволяет сравнить токсикологический эффект разных токсинов. Величина  $LD_{50}$  яда обыкновенных гадюк, обитающих в разных местах своего ареала, в силу их генетической специфики, а также ряда географических особенностей местообитаний может оказаться вариабельной величиной. Эти обстоятельства необходимо учитывать при проведении контроля качества ядов, организации промышленного производства ядов гадюк и при получении лекарственных препаратов на их основе. Поэтому цель данной работы – исследовать внутривидовые различия в токсичности яда обыкновенных гадюк, обитающих в различных пунктах своего ареала.

### Материалы и методы

**Эксперименты по токсикометрии** ядов обыкновенной гадюки планировали и проводили согласно рекомендациям ВОЗ [6] и по методике, описанной в работе М.Е. Безрукова с соавторами [2].

**Экспериментальные животные.** Все опыты по определению среднесмертельной дозы  $LD_{50}$  змеиных ядов проводили на белых лабораторных мышах – самцах массой  $20 \pm 1$  г. Мышей разводили в питомнике экспериментальных животных и содержали на обычном рационе вивария (зерно, овощи, крупы). В день проведения опыта животных не кормили. Экспериментальные группы мышей состояли из 8-12 животных.

**Образцы яда обыкновенной гадюки.** Яд обыкновенных гадюк из разных административных областей или республик собирали в 2001-2006 гг. и анализировали отдельно. Образцы представляли собой яд, собранный от нескольких (5-10) животных обоего пола. Если предоставлялась возможность, образцы яда гадюк собирали отдельно у самцов и самок.

**Получение образцов яда.** Яд получали ручным способом, массируя ядовитые железы, в чашки Петри диаметром 40 мм. Яд высушивали две недели в эксикаторе над хлористым кальцием при комнатной температуре и хранили в стеклянной таре при температуре  $+5-6^{\circ}C$  в холодильнике. При таком способе высушивания и хранения яд сохраняет свою биологическую активность как минимум три года [7]. Мы анализировали образцы яда в течение полугода после их получения.

**Инъекция растворов ядов.** Растворы ядов готовили непосредственно перед опытом, растворяя навеску яда в физиологическом растворе, инкубировали при  $37^{\circ}C$  20 мин и использовали в эксперименте в течение часа после приготовления. Стандартная концентрация раствора яда составляла 1 мг/мл. Инъекции яда животным проводили микрошприцом (20-100 мкл) подкожно в область верхней части левого бедра. Наблюдение за животными прекращали через 24 часа, фиксируя количество погибших и выжив-

ших животных. Контрольной группе животных вводили только физиологический раствор.

**Определение ЛД<sub>50</sub>.** Среднесмертельную дозу ЛД<sub>50</sub> определяли методом модифицированного пробит-анализа [2, 3].

### Результаты и обсуждение

Административные области и республики, где был собран яд, представляют собой значительное разнообразие географических и экологических условий местообитаний обыкновенной гадюки. В местах сбора образцов обитают обыкновенные гадюки двух подвидов – *Vipera berus berus* и *V. b. nikolskii* разных цветовых форм и с различными наборами внешних морфологических признаков [1].

В работе мы определили среднесмертельную дозу яда обыкновенной гадюки из разных пунктов ареала. Данные представлены в табл. 1, из которой видно что различия в значениях ЛД<sub>50</sub> укладываются в ошибку определения – величина ЛД<sub>50</sub> не выходит за границы пределов, определяемых ошибкой опыта. Даже если сравнивать крайние значения ЛД<sub>50</sub> (минимальное значение  $2,91 \pm 0,52$  мг/кг с максимальным  $4,72 \pm 1,09$  мг/кг), то на 5%-ном уровне значимости различия оказываются недостоверными. Получается, что у всех образцов яда с исследованных территорий ЛД<sub>50</sub> не имеет достоверных отличий.

Напомним, что при использованном нами спо-

**Таблица 1.** ЛД<sub>50</sub> образцов яда обыкновенных гадюк из различных точек ареала

Область сбора образцов	М ± m
Нижегородская	$3,17 \pm 0,36$
Самарская	$3,96 \pm 0,52$
Ульяновская	$3,85 \pm 0,65$
Республика Татарстан	$3,61 \pm 0,66$
Республика Мордовия	$2,97 \pm 0,67$
Республика Чувашия	$4,72 \pm 1,09$
Пензенская	$4,08 \pm 0,73$
Граница Пензенской и Саратовской областей	$2,91 \pm 0,52$
Саратовская	$3,61 \pm 0,51$
Пермская	$3,20 \pm 0,72$
Харьковская	$3,04 \pm 0,60$

собе получения образцов ядовитого секрета корректно говорить при их сравнении лишь о различиях географического характера. В «объединенном» образце собран яд от нескольких экземпляров гадюк, различающихся по генетической специфике, полу, размеру, возрасту и физиологическому состоянию, т.е. во всех образцах индивидуальные различия в той или иной степени усреднены.

Аналогичные исследования ядовитого секрета, проведенные на других объектах – ядовитых змеях Средней Азии [4, 5], говорят о существовании межпопуляционных отличий в токсичности ядов. В то же время Я.Д. Давлятовым [5] отмечалось, что у обыкновенной гадюки межпопуляционные различия в токсичности яда выражены значительно слабее, чем у гюрзы и кобры (к сожалению, в публикации не приводились конкретные цифры, подтверждающие это положение). В пользу того, что фактор географической изменчивости свойств ядов имеет место, говорят и обнаруженные различия в токсичности и активности протеазы яда *Vipera russelli* из различных регионов Индии [10].

Есть мнение, что географическая изменчивость свойств ядов наиболее сильно проявляется в крупных популяциях, где идет свободный обмен генетическим материалом, в то время как в малых и изолированных популяциях ядовитые змеи продуцируют более гомогенный по свойствам ядовитый секрет [15, 16].

В следующей серии экспериментов мы попытались обнаружить различия в токсичности, обусловленные полом животных. Для этого определили ЛД<sub>50</sub> яда, взятого отдельно у самцов и самок (из популяции обыкновенных гадюк, обитающих в черте г. Самары). Данные представлены в табл. 2.

**Таблица 2.** ЛД<sub>50</sub> яда самцов и самок обыкновенной гадюки из г. Самара

Пол	ЛД <sub>50</sub> (мг/кг) М ± m
Самцы	$3,96 \pm 0,52$
Самки	$3,68 \pm 0,50$

Как видно из табл. 2, достоверных различий не обнаруживается, т.е. самки и самцы обыкновенной гадюки из одной популяции продуцируют ядовитый секрет с примерно одинаковым значением ЛД<sub>50</sub>. Видимо, в плане токсичности ядовитого секрета ни самцы, ни самки в популяции не обладают какими-то преимуществами по отношению к добыче потенциальных пищевых объектов. Аналогичные результаты были получены и другими исследователями, в работах которых было показано отсутствие половых различий в токсичности и составе ядов [8, 11, 14]. Как они считают, пол змей не является причиной, влияющей на изменчивость свойств ядов [12].

Но не следует забывать, что проанализированные нами образцы являются «объединенными», т.е. суммируют яд от нескольких особей

одного пола, и в этом образце нивелированы индивидуальные отличия, присущие отдельным особям. В то же время индивидуальные отличия в токсичности ядовитого секрета существуют – ранее было показано, что ЛД<sub>50</sub> образцов яда песчаной эфы *Echis carinatus* (особи из одного помета) имеют значимые отличия [14]. Считается, что индивидуальная изменчивость свойств ядовитого секрета находится под генетическим контролем и служит основой микроэволюционного процесса [9, 13].

Из полученных результатов следует, что достоверных внутривидовых отличий в токсичности ядовитого секрета обыкновенной гадюки на территории значительной части ареала – от Пермской до Харьковской областей – нам обнаружить не удалось. Вполне вероятно, что ограни-

ченные возможности методов токсикометрии не позволили нам выявить различия внутри обозначенных популяций обыкновенной гадюки. Видимо, внутривидовые отличия свойств яда следует искать на уровне активностей ферментов и пептидного состава, используя «индивидуальные» образцы яда, полученные от отдельных особей.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность своим коллегам, предоставившим в их распоряжение образцы ядов обыкновенной гадюки – В.Г. Старкову, А.В. Павлову, Н.А. Литвинову, О.А. Ермакову, А.И. Зиненко, В.А. Кривошееву.

Работа выполнена по Программе «Биоресурсы» Отделения биологических наук РАН.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Изд-во Самар. НЦ РАН, 2004.
2. Безруков М.Е., Гелашвили Д.Б., Силкин А.А. Методы токсикометрии в биомониторинге // Экологический мониторинг. Методы биомониторинга. Учеб. пособие / Под ред. Д.Б. Гелашвили. Н.Новгород, 1995. Ч. 2.
3. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Изд-во медицинской лит-ры, 1963.
4. Давлятов Я.Д. Видовые и внутривидовые особенности в спектре и свойстве ядов змей // Вопросы герпетологии. Л.: Наука, 1981.
5. Давлятов Я.Д. Некоторые результаты изучения изменчивости ядов змей // Вопросы герпетологии. Л.: Наука, 1985.
6. Принципы и методы оценки токсичности химических веществ. Часть 1. Гигиенические критерии состояния окружающей среды, 6. Женева, 1981.
7. Яд гадюки обыкновенной сухой. Временная фармакопейная статья: ВФС 42-3026-98. М., 1998.
8. Chippaux J.P., Boche J., Courtois B. Electrophoretic patterns of the venoms from a litter of *Bitis gabonica* snakes // *Toxicon*. 1982. V. 27.
9. Chippaux J.P., Williams V., White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation // *Toxicon*. 1991. V. 29.
10. Jayanthi G.P., Veerabasappa Gowda T. Geographical variation in India in the composition and lethal potency of Russell's Viper (*Vipera russelli*) venom // *Toxicon*. 1988. V. 26.
11. Glenn J., Straight R.C. The midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*) venom: lethal toxicity and individual variability // *Toxicon*. 1977. V. 15.
12. Latifi M. Variation in yield and lethality of venom from Iranian snakes // *Toxicon*. 1984. V. 22.
13. Mebs D. Snake venom composition and evolution of Viperidae // *Kaupia*. 1999. V. 8.
14. Taborska E. Intraspecific variability of the venom of *Echis carinatus* // *Physiol. Bohemoslov.* 1971. V. 20.
15. Williams V., White J. Variation in venom constituents within a single isolated population of Peninsula tiger snake (*Notechis ater niger*) // *Toxicon*. 1987. V. 25.
16. Williams V., White J., Swaner T.D., Sparrow A. Variation in venom proteins from isolated population of tiger snakes (*Notechis ater niger*, *N. scutatus*) in South Australia // *Toxicon*. 1988. V. 26.

### TOXICITY OF *VIPERA BERUS* VENOM FROM DIFFERENT POINTS OF ITS AREA

© 2007 A.L. Malenyov, A.G. Bakiev, O.V. Zaitseva, I.V. Shurshina  
Institute of ecology of Volga river basin of Russian Academy of Science, Togliatti

Results of toxicology experiments (measurements lethal doses DL<sub>50</sub>) of venom samples of common adder (*Vipera berus*) from different points of its area (regions of Samara, Nizhniy Novgorod, Ulyanovsk, Penza, Saratov, Perm, Kharkov and Tatarstan Republic, Mordovia Republic and Chuvashia Republic) are submitted in the article.