

УДК 591.145.3:598.126.3

## ТОКСИЧНОСТЬ ЯДА ОБЫКНОВЕННОЙ ГАДЮКИ *VIPERA BERUS* ДЛЯ ОЗЕРНЫХ ЛЯГУШЕК *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*

© 2013 А.Л. Маленев, Р.А. Горелов, А.Г. Бакиев

Институт экологии Волжского бассейна Российской академии наук, г. Тольятти

Поступила 10.12.2013

В статье приведены результаты определения среднесмертельной дозы (ЛД<sub>50</sub>) яда обыкновенных гадюк *Vipera berus* из Волжского и Донского бассейнов для сеголетков озерной лягушки *Pelophylax ridibundus*. Яд из популяций с преобладанием признаков *V. b. berus* имеет более высокие значения ЛД<sub>50</sub>, чем из популяций с преобладанием признаков *V. b. nikolskii*.

**Ключевые слова:** обыкновенная гадюка *Vipera berus*, ядовитый секрет, токсичность, среднесмертельная доза ЛД<sub>50</sub>, озерная лягушка *Pelophylax ridibundus*.

В настоящее время мы полагаем, что в Волжском бассейне обыкновенная гадюка представлена двумя подвидами – номинативным *Vipera berus berus* и лесостепным, или гадюкой Никольского *V. b. nikolskii*. По морфологическим данным, зона интерградации двух подвидов занимает значительную часть бассейна Волги: наиболее «чистые» популяции номинативного подвида известны для отдельных регионов Верхнего Поволжья, а в других поволжских популяциях обнаруживаются морфологические признаки обеих форм, при этом подвидовые признаки *V. b. nikolskii* наиболее выражены у водораздела с Донским бассейном. Районы Донского бассейна, прилегающие к Волжскому бассейну, населяют популяции с преобладанием признаков *V. b. nikolskii* [1, 2, 8, 10-12, 14, 15].

Одним из диагностических признаков гадюки Никольского является бесцветный яд, у номинативного подвида он желтого цвета [15]. По характерному пептидному составу яда к *V. b. nikolskii* относится часть гадюк из популяций у границы речных бассейнов Волги и Дона, остальные гадюки из Волжского бассейна имеют пептидный состав яда, характерный для *V. b. berus* [1, 2, 10]. Кроме различий в пептидном составе, у двух подвидов гадюк в ядовитом секрете были отмечены статистически значимые различия в активности ферментов – протеазы и оксидазы L-аминокислот [7].

В то же время, токсичность яда (среднесмертельная доза ЛД<sub>50</sub>), ранее определенная нами на белых лабораторных мышах при подкожном введении, для данных подвидов гадюк не различается [9] – в яде гадюк номинативного подвида ЛД<sub>50</sub> составляет 3,0–4,7 мкг/г, а в яде гадюки Никольского – 2,9–4,1 мкг/г. В.Г. Старков и соавторы

[16] также не обнаружили значительных различий в токсичности яда вышеуказанных подвидов для банановых сверчков *Gryllus assimilis*: среднесмертельная доза яда номинативного подвида равна 81,9 мкг/г, а яда гадюки Никольского – 84,8 мкг/г.

В данной работе на сеголетках озерной лягушки были определены значения среднесмертельной дозы ЛД<sub>50</sub> образцов яда обыкновенных гадюк разной подвидовой принадлежности и из различных популяций.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Экспериментальные животные.** Все эксперименты по токсикометрии ядов обыкновенной гадюки были проведены на сеголетках озерной лягушки *Pelophylax ridibundus*. Сеголетков озерной лягушки отлавливали в пойме р. Ахтуба (Красноярский район Астраханской области, окрестности ст. Досанг) в конце августа – начале сентября 2013 г. В опытах использовали лягушат массой 2,0–3,5 г за исключением тех случаев, когда нужны были лягушки другой массы. После отлова лягушек выдерживали сутки при комнатной температуре (25–27°C) для опорожнения кишечника, взвешивали на электронных весах «Ohaus Scout Pro» и формировали разные весовые группы (2,1–2,5 г, 2,6–3,0 г и 3,1–3,5 г). Для определения ЛД<sub>50</sub> одного образца яда использовали лягушек одной весовой группы.

**Образцы ядов гадюк.** Образцы ядов обыкновенной гадюки представляли собой яд, полученный от нескольких гадюк (от 10 до 30 экз.) из одной популяции и отловленных в одно время. Образцы яда были получены от гадюк, отловленных в 2009–2013 гг. в бассейне Средней и Нижней Волги и прилегающих к нему районов Донского бассейна, и хранились в лаборатории в условиях, обеспечивающих сохранность их биологической активности в течение нескольких лет. Для удобства обозначения образцов яда использовали их географическую приуроченность к местам отлова гадюк. В экспериментах использовали водные

Маленев Андрей Львович, кандидат биологических наук, malenyov@mail.ru; Горелов Роман Андреевич, аспирант, gorelov.roman@mail.ru; Бакиев Андрей Геннадьевич, кандидат биологических наук, herpetology@list.ru

растворы ядов в концентрации 5 мг/мл для номинативного подвида обыкновенной гадюки и 2 мг/мл для яда гадюки Никольского.

**Токсикометрия.** Определение среднесмертельной дозы ЛД<sub>50</sub> ядов гадюк проводили стандартным методом, принцип которого подробно описан в литературе [3, 4, 13]. Для определения значения среднесмертельной дозы проводили инъекции возрастающих доз водных растворов яда группам экспериментальных животных одинакового веса. В каждом эксперименте использовали 30 лягушек – 6 групп лягушек по 5 особей; животным в группах вводили по 5, 10, 15, 20, 25, 30 мкл раствора яда. Инъекции растворов ядов гадюк проводили внутрибрюшинно в правую нижнюю четверть брюшной поверхности лягушки с использованием микрошприца объемом 0–30 мкл («Chirana», Чехия). В качестве контроля использовали группу лягушек (5 шт.), которым вводили максимальный объем (30 мкл) дистиллированной воды. В наших экспериментальных условиях лягушки контрольных групп оставались живыми не только в течение времени наблюдения (24 часа), но и в течение последующих трех–четырёх суток. Эксперименты по токсикометрии проводили при комнатной температуре (25–27°C), и наблюдение прекращали через 24 часа после введения яда, подсчитывая число погибших и выживших животных.

**Пробит-анализ.** Для каждого образца яда проводили как минимум два независимых определения ЛД<sub>50</sub> в одинаковых условиях. Значение среднесмертельной дозы ЛД<sub>50</sub> рассчитывали ме-

тодом модифицированного пробит-анализа [4]. Среднее значение ЛД<sub>50</sub> рассчитывали по результатам двух независимых острых опытов, объединяя в одну линейку все эффективные дозы. При этом количество экспериментальных групп лягушек увеличивалось в два раза (с шести до двенадцати), а количество животных в группе оставалось неизменным (5 особей). Значения среднесмертельной дозы ядовитого секрета выражали в мкг яда/г веса экспериментальных животных.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отловленные для экспериментов озерные лягушки были представлены двумя фенетическими формами: «полосатая» – со светлой дорсомедиальной полосой (морфа «striata») – и «бесполосая», причем соотношение двух форм варьировало в разных биотопах. Как известно из литературных источников [5, 6], эти две формы (у лягушек озерной и остромордой) отличаются уровнем и скоростью метаболизма, степенью накопления ряда элементов, интенсивностью легочного дыхания, продолжительностью жизни и устойчивостью к антропогенной трансформации среды. Такие физиологические различия двух морф не исключают возможности искажения результатов токсикометрических экспериментов. Поэтому первоначально мы определили значение среднесмертельной дозы ЛД<sub>50</sub> яда обыкновенной гадюки для лягушек разных морф, но одной весовой группы (табл. 1).

**Таблица 1.** ЛД<sub>50</sub> яда обыкновенной гадюки для разных морф озерной лягушки

Морфа	ЛД <sub>50</sub> , мкг/г <i>M±m</i>		<i>t<sub>φ</sub></i>	<i>P</i>
со светлой продольной полосой на спине	35,3±3,31	37,3±2,58	0,53	>0,05
	39,8±3,46			
без светлой продольной полосы на спине	39,3±6,40	39,5±3,29		
	39,8±3,46			

Примечание: в эксперименте использовали яд гадюк номинативного подвида из Нижегородской области, концентрация яда 5 мг/мл; масса лягушек в группах 2,0–3,5 г.

Как видно из табл. 1, достоверных различий в значениях ЛД<sub>50</sub> не выявлено, что говорит об одинаковом результате воздействия ядовитого секрета на две разные морфы озерных лягушек с отмеченными выше особенностями метаболизма. Тем не менее, в дальнейших экспериментах мы все-таки старались использовать лягушек одной морфы – бесполосых, встречаемость которых в местах отлова была значительно выше.

Заметим, что для групп лягушек с большей средней массой абсолютное значение ЛД<sub>50</sub> оказалось ниже такового для лягушек в группах меньшей массы. Значения ЛД<sub>50</sub> яда гадюк из Новгородской области на лягушках разных весовых групп (1,6–2,0, 2,1–2,5 и 3,6–4,0 г) составили 52,3,

46,3 и 33,4 мкг/г соответственно. Поэтому в дальнейших экспериментах мы старались проводить два определения ЛД<sub>50</sub> одного образца яда на лягушках сходных весовых групп.

Для выявления подвидовых различий в токсичности ядов гадюк мы проанализировали ЛД<sub>50</sub> образцов ядовитого секрета гадюк разной подвидовой принадлежности из разных популяций в Волжском и Донском речных бассейнах. Результаты этих экспериментов приведены в табл. 2, где данные ранжированы в порядке снижения значений ЛД<sub>50</sub> и, соответственно, возрастания токсичности образца яда.

Значения ЛД<sub>50</sub> всех исследованных образцов ядов разбиваются на две большие группы, разли-

чающиеся между собой. Это – группа высоких значений ЛД<sub>50</sub>, характерная для яда обыкновенных гадюк с преобладающими признаками номинативного подвида, и группа низких значений ЛД<sub>50</sub>, характерная для яда гадюк с преобладающими признаками лесостепного подвида. При сравнении значений ЛД<sub>50</sub> ядов номинативного и лесостепного подвидов выявлено, что у первого подвида они многократно (в 3–6 раз) и статистически значимо выше. Это свидетельствует о том, что яд гадюки Никольского значительно более токсичен для озерных лягушек по сравнению с таковым у гадюк номинативного подвида. Полученные данные мы не можем объяснить пищевыми предпочтениями двух подвидов гадюк, поскольку они расходятся с нашими представлениями о незначительных различиях в трофиче-

ских предпочтениях. На наш взгляд, анализу соответствия токсичности ядов гадюк их пищевым предпочтениям необходимо уделить более пристальное внимание, включив в экспериментальное определение ЛД<sub>50</sub> более широкий спектр пищевых объектов, отмеченных в литературе.

Значения ЛД<sub>50</sub> яда гадюк из разных популяций с преобладанием признаков *V. b. berus* различаются между собой: наименее токсичный яд имеют гадюки из Республики Татарстан (ЛД<sub>50</sub>=51,9±4,43 мг/г), а наиболее токсичный яд получен от гадюк из Пермского края (ЛД<sub>50</sub>=30,6±1,96 мг/г). Различия этих значений ЛД<sub>50</sub> статистически значимы ( $t_{\phi}=4,40$ ,  $P<0,001$ ). А значения ЛД<sub>50</sub> яда из разных популяций с преобладанием признаков *V. b. nikolskii* практически одинаковы и не имеют между собой статистически значимых различий.

**Таблица 2.** Географические различия ЛД<sub>50</sub> яда обыкновенной гадюки для озерной лягушки

Преобладают признаки подвида	Место отлова	Цвет яда	ЛД <sub>50</sub> , мкг/г, М±m
<i>V. b. berus</i>	Республика Татарстан, Лаишевский район	желтый	51,9±4,43
	Республика Мордовия, Ковылкинский район	желтый	50,8±4,89
	Самарская область, Ставропольский район	желтый	48,8±5,05
	Самарская обл., г. Самара	желтый	47,4±3,31
	Республика Чувашия, Алатырский район	желтый	42,3±4,50
	Новгородская область, Боровичский район	желтый	41,1±3,87
	Нижегородская область, Тоншаевский район	желтый	37,2±2,60
	Московская область, Раменский район	желтый	32,7±4,58
	Пермский край, Чердынский район	желтый	30,6±1,96
<i>V. b. nikolskii</i>	Липецкая область, Добровский район	бесцветный	10,9±1,13
	Пензенская область, Пензенский район	бесцветный	9,9±1,51
	Саратовская область, Хвалынский район	желтоватый	9,6±1,91
	Саратовская область, Аткарский район	бесцветный	9,2±1,68
	Пензенская область, Пензенский район	желтоватый	8,9±1,59

В табл. 2 отмечен также цвет ядовитого секрета гадюк из исследованных популяций. Напомним, что у гадюк номинативного подвида мы всегда отмечаем яд ярко-желтого цвета, тогда как у гадюк Никольского встречается и бесцветный, и желтоватый яд (слабой желтой окраски) [2, 7]. Сравнение значений ЛД<sub>50</sub> бесцветного и желтоватого яда у гадюк из Пензенского района Пензенской области не выявило статистически значимых различий. Ранее проведенный биохимический анализ яда гадюк Никольского из этих популяций показал, что данные образцы отличались активностью оксидазы L-аминокислот, которая и опре-

деляет цвет ядовитого секрета. Получается, что, несмотря на значительные различия в активности оксидазы L-аминокислот у особей в популяциях, токсичность их яда для сеголеток лягушек одинакова.

Таким образом, анализ среднесмертельной дозы ЛД<sub>50</sub> образцов ядовитого секрета обыкновенной гадюки выявил межподвидовые и внутривидовые различия в его токсичности для озерной лягушки, биологический смысл которых пока неясен. В частности, необъясненным остается тот факт, что для лягушек яд гадюки Никольского

более токсичен, чем яд гадюк номинативного подвида.

Нам представляется перспективным сравнительный анализ ЛД<sub>50</sub> яда одного и того же образца яда гадюк на разных пищевых объектах. Это позволит построить сравнительный ряд токсичности ядовитого секрета для нескольких видов добычи и выявить возможную связь пищевых предпочтений гадюк с токсичностью их ядовитого секрета.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность за помощь в отлове экспериментальных животных А.А. Клёниной и М.А. Храмовой.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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». 2008. Т. 17, № 4. С. 759-816.
2. Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Зайцева О.В., Шуришина И.В. Змеи Самарской области. Тольятти: Кассандра, 2009. 170 с.
3. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта // Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1963. 162 с.
4. Безруков М.Е., Гелашивили 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.
5. Вершинин В.Л. Морфа striata и ее роль в путях адаптации рода *Rana* в современной биосфере // Доклады АН. 2004. Т. 396, № 2. С. 1-3.
6. Вершинин В.Л. Морфа striata у представителей рода *Rana* (Amphibia, Anura) – причины адаптивности к изменениям среды // Журн. общ. биологии. 2008. Т. 69, № 1. С. 65-71.
7. Зайцева О.В. Популяционные особенности ядовитого секрета обыкновенной гадюки *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) в Волжском бассейне: Дис. ... канд. биол. наук. Тольятти, 2011. 108 с.
8. Зиненко А.И. Особенности морфологии *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) и *Vipera nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva, 1986 – следствие интрогрессивной гибридизации? // Змеи Восточной Европы: Материалы международного конф. Тольятти, 2003. С. 20-22.
9. Маленев А.Л., Бакиев А.Г., Зайцева О.В., Шуришина И.В. Токсичность яда обыкновенных гадюк из различных пунктов ареала // Изв. Самар. НЦ РАН. 2007. Т. 9, № 1. С. 259-261.
10. Маленев А.Л., Зайцева О.В., Бакиев А.Г., Зиненко А.И. Обыкновенная гадюка на границе речных бассейнов Волги и Дона: особенности морфологии змей и свойств ядовитого секрета в популяции из Пензенской области // Современная герпетология. 2010. Т. 10, вып. 3/4. С. 115-120.
11. Мильто К.Д. Распространение и морфологические особенности черной лесостепной гадюки // Змеи Восточной Европы: Материалы международного конф. Тольятти, 2003. С. 56-57.
12. Павлов А.В., Петрова И.В., Хайрутдинов И.З. К морфологии и систематике обыкновенной гадюки *Vipera berus* L. заповедника // Научные труды Государственного природного заповедника «Большая Кокшага». Вып. 5. Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2011. С. 278-289.
13. Принципы и методы оценки токсичности химических веществ. Часть 1. Гигиенические критерии состояния окружающей среды, 6. Женева, 1981.
14. 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/IB: Schlangen (Serpentes) III. Viperidae. Wiebelsheim: AULA-Verlag, 2005. S. 293-309.
15. Milto K.D., Zinenko O.I. Distribution and Morphological Variability of *Vipera berus* in Eastern Europe // Herpetologia Petropolitana: Proc. of the 12<sup>th</sup> Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica. St. Petersburg, 2005. P. 64-73.
16. Starkov V.G., Osipov A.V., Utkin Y.N. Toxicity of venoms from vipers of *Pelias* group to crickets *Gryllus assimilis* and its relation to snake entomophagy // Toxicon. 2007. V. 49. P. 995-1001.

### TOXICITY OF ADDER *VIPERA BERUS* VENOM FOR LAKE FROGS *PELOPHYLAX RIDIBUNDUS*

© 2013 A.L. Malenyov, R.A. Gorelov, A.G. Bakiev

Institute of ecology of Volga river basin of Russian Academy of Science, Togliatti

The results of definition lethal doses (DL<sub>50</sub>) of adder's venom *Vipera berus* from the Volga and Don bassins for juveniles of lake frog *Pelophylax ridibundus* are submitted in article. A venom's samples from populations with prevalence signs *V. b. berus* has higher DL<sub>50</sub> values than that from populations with prevalence signs *V. b. nikolskii*.

**Key words:** adder *Vipera berus*, venom, toxicity, DL<sub>50</sub>, lake frog *Pelophylax ridibundus*.