

ЯДООТДАЧА И СВОЙСТВА ЯДОВИТОГО СЕКРЕТА ВОСТОЧНОЙ СТЕПНОЙ ГАДЮКИ *VIPERA RENARDI* В РАЗНОЕ ВРЕМЯ СЕЗОННОЙ АКТИВНОСТИ

А. Л. Маленёв, Р. А. Горелов, Т. Н. Атяшева, А. Г. Бакиев

Институт экологии Волжского бассейна РАН
Россия, 445003, Тольятти, Комзина, 10
E-mail: malenyov@mail.ru

Поступила в редакцию 18.10.2016 г.

Показано, что у восточных степных гадюк *Vipera renardi* (Christoph, 1861) ядоотдача летом выше, чем весной и осенью. Сезонной изменчивости токсичности яда (среднесмертельной дозы ЛД₅₀ для банановых сверчков *Gryllus locorojo* Weissman et Gray, 2012) и активностей ферментов в нем (протеаз, оксидазы L-аминокислот) выявить не удалось.

Ключевые слова: *Vipera renardi*, ядовитый секрет, ядоотдача, среднесмертельная доза ЛД₅₀, банановые сверчки, протеазы, оксидаза L-аминокислот.

DOI: 10.18500/1814-6090-2016-16-3-4-129-134

ВВЕДЕНИЕ

Восточная степная гадюка *Vipera renardi* относится к наиболее распространенным в Европейской России ядовитым змеям. Сведения об изменчивости ядопродуктивности и свойств ядовитого секрета этой гадюки имеют не только теоретический, но и практический интерес, поскольку ее укусам подвергаются люди и домашние животные, а яд является ценным фармацевтическим сырьем.

К настоящему времени опубликованы материалы по ядоотдаче и свойствам яда восточной степной гадюки (Раявээ, 1963; Яды змеиные..., 1977; Орлов и др., 1982, 1990; Яд гадюки..., 1998; Бакиев и др., 2008, 2009, 2015; Шуршина, 2009; Ширяева, 2011; Маленёв и др., 2014, 2015; Гелашвили и др., 2015; Горелов, Маленёв, 2016 а, б; Starkov et al., 2007). Вопросы сезонной изменчивости названных характеристик в опубликованных материалах не затрагивались.

Целью данной работы является сравнительная оценка ядоотдачи, токсичности и активностей ферментов яда восточной степной гадюки в разные периоды сезона активности.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследований послужили образцы ядовитого секрета *V. renardi*.

Для изучения сезонных особенностей ядоотдачи и свойств ядовитого секрета использовали яд взрослых гадюк ($n = 71$), отловленных в окрестностях с. Апалиха Хвалынского района Саратовской области 2 – 9 мая, 12 – 17 июня и 21 – 22 августа 2015 г. Гадюк 5 – 7 дней после поимки пердерживали в террариумах и собирали от них

образцы ядовитого секрета, затем змей возвращали в места отлова.

Для изучения сезонной динамики ядоотдачи использовали также яд молодых гадюк ($n = 30$), полученных от беременных самок. Последних отловили в окрестностях с. Вязовка Радищевского района Ульяновской области летом 2014 г. После родов самок выпустили в места отлова. Отбор яда у молоди проводили с момента рождения до ухода на третью зимовку с периодичностью 40 – 45 дней: в августе, октябре и ноябре 2014 г., апреле, июне, июле, августе и октябре 2015 г., апреле, мае, июле, августе и октябре 2016 г.

Ядовитый секрет. Отбор яда у взрослых гадюк проводили механическим способом, и яд от каждой гадюки собирали в отдельную чашку Петри. Ядовитый секрет высушивали над хлористым кальцием в течение 12 – 14 дней и хранили образцы яда в темноте при 5 – 6 °С в холодильнике. У каждой гадюки фиксировали индивидуальную ядоотдачу, взвешивая сухой яд после высушивания.

От взрослых гадюк всего за сезон 2015 г. получили 71 индивидуальный образец сухого яда, каждый из которых проанализировали на активности протеолитических ферментов и оксидазы L-аминокислот. После этого индивидуальные образцы объединили в группы следующим образом: самцы (весна), самки (весна), самцы (лето), самки (лето), самцы (осень) и самки (осень). В этих шести объединенных образцах яда определили среднесмертельную дозу ЛД₅₀ для насекомых.

У молодых гадюк яд отбирали механическим способом на предметное стекло с зашлифо-

ванной кромкой, чтобы не повредить мягкие ткани ротовой полости. Яд на стеклах высушивали в эксикаторе и взвешиванием определяли индивидуальный выход ядовитого секрета. От молодых гадюк в 2014 – 2016 гг. получили 370 индивидуальных образцов сухого яда (2014 г. – 90, 2015 г. – 140 и 2016 г. – 140).

Анализ $ЛД_{50}$ в объединенных образцах яда взрослых гадюк проводили на лабораторной культуре банановых сверчков *Gryllus locorojo*, которых содержали и разводили в лаборатории (Горелов, Маленёв, 2016 а). В экспериментах использовали самцов и самок сверчков на стадии предимаго массой 0.5 – 0.6 г, объединенных в 6 групп по 5 шт. в каждой. Для инъекций применяли водные растворы ядовитого секрета в концентрации 2.0 мг/мл и дозы 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 60.0 мкг/г. Внутривенные инъекции растворов яда насекомым делали микрошприцом в правую нижнюю четверть брюшка с дорзальной стороны. Определение $ЛД_{50}$ в каждом образце яда проводили дважды. Значения $ЛД_{50}$ рассчитывали методом модифицированного пробит-анализа (Беленький, 1963; Гелашвили и др., 2016), используя усредненные по двум определениям результаты.

Определение активности протеолитических ферментов проводили колориметрически (Murata et al., 1963), используя в качестве субстрата казеин коровьего молока («Sigma-Aldrich»). За единицу протеолитической активности принимали такое количество препарата, которое, действуя в течение 1 мин на 2%-ный раствор субстрата при 37 °C и pH 8.2, образует продукты гидролиза, не осаждаемые трихлоруксусной кислотой, в количестве, эквивалентном 1 мкмоль L-тирозина (Яд гадюки..., 1998). Приведенные ниже значения удельной протеолитической (казеинолитической) активности выражены в мкг образовавшегося тирозина за одну минуту в пересчете на 1 мг белка.

Определение активности оксидазы L-аминокислот проводили спектрофотометрически с помощью L-фенилаланина в качестве субстрата (Wellner, Lichtenberg, 1966). За одну единицу активности (Е) принимали количество фермента, показывающее поглощение 0.030 ед. оптической плотности при 300 нм. Данная единица соответствует количеству фермента, которое в аналогичных условиях катализирует выделение 1 мкл кислорода за 30 мин, измеренное ранее манометрическим способом (Wellner, Meister, 1960). Удельную активность фермента выражали в Е/мг белка в мин.

Концентрацию белка в растворах определяли методом Лоури (Lowry et al., 1951).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ядоотдача. Результаты выхода яда взрослых восточных степных гадюк в разные периоды сезона активности 2015 г. представлены в табл. 1. Рис. 1, а визуализирует результат по средним выборочным и их ошибкам применительно к самцам и самкам.

Таблица 1

Ядоотдача взрослых восточных степных гадюк в разное время сезона активности 2015 г.

Месяц	Пол	n	Ядоотдача, мг	
			lim	$M \pm m$
Май	Самцы и самки	24	4.0–42.0	15.5±2.05
	Самцы	14	4.0–18.0	9.0±1.06
	Самки	10	12.0–42.0	24.6±2.76
Июнь	Самцы и самки	19	1.0–50.0	22.0±2.86
	Самцы	8	1.0–33.0	15.9±3.22
	Самки	11	9.0–50.0	26.4±3.93
Август	Самцы и самки	22	3.0–31.0	10.3±1.51
	Самцы	8	3.0–14.0	7.1±1.36
	Самки	14	3.0–31.0	12.1±2.13

При сравнении средних видно, что и у самцов, и у самок ядоотдача от весны (май) к лету (июнь) возрастает, а к осени (август) опять снижается. Однако не все сезонные различия являются статистически значимыми. Так, при сравнении выборок, включающих только самцов, достоверной на 5%-ном уровне, является разница между маем и июнем, июнем и августом, а в случае с выборками самок – между маем и августом, июнем и августом.

Сходную картину мы получили ранее на обыкновенной гадюке. В 2014 г. у обыкновенных гадюк из г. Самара в апреле и сентябре ядоотдача была значимо ниже, чем в мае – июле (Бакиев и др., 2015; Горелов, 2015).

Остановимся на половых различиях у восточной степной гадюки. Самцы отличались от самок в каждый из периодов в среднем меньшей ядоотдачей. В высшей степени достоверной ($P < 0.001$) оказалась разница ядоотдачи самцов и самок в мае 2015 г. Различия между самками и самцами гадюк в ядоотдаче мы связываем с их размерами и массой: в каждый из периодов самцы отличались от самок в среднем меньшими размерами и массой тела.

Ранее на примере обыкновенной и восточной степной гадюк мы показали, что выход яда увеличивается с увеличением размеров и массы змей, причем в выборке степных гадюк зависи-

ЯДООТДАЧА И СВОЙСТВА ЯДОВИТОГО СЕКРЕТА ВОСТОЧНОЙ СТЕПНОЙ ГАДЮКИ

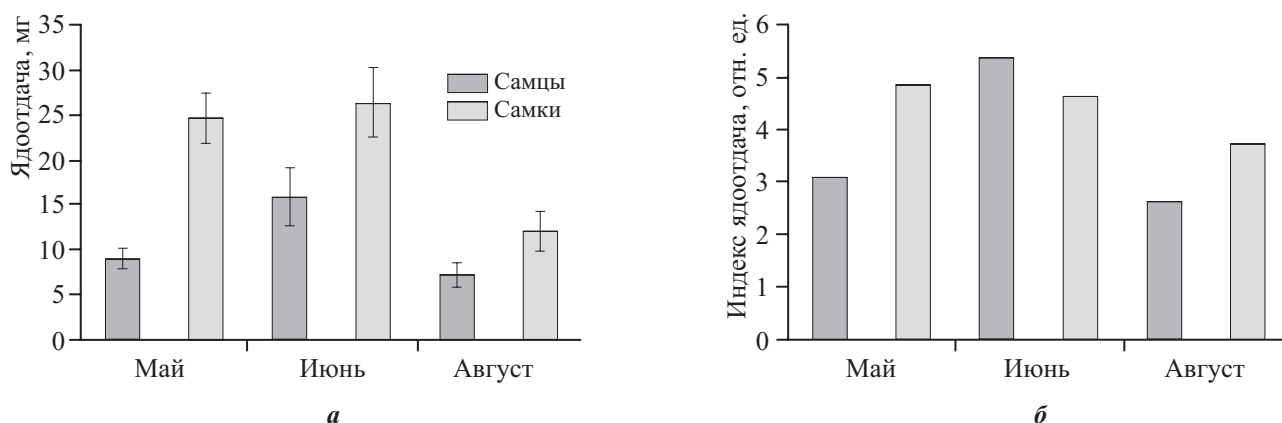


Рис. 1. Ядоотдача (а) и индекс ядоотдачи (б) взрослых восточных степных гадюк в разное время сезона активности 2015 г.

мость ядоотдачи от массы тела была близка к прямо пропорциональной (Бакиев и др., 2015; Маленёв и др., 2015).

При прямо пропорциональной зависимости между выходом ядовитого секрета и массой восточной степной гадюки легко рассчитать величину выхода яда на единицу массы тела. Частное от деления массы сухого яда, полученного от змеи, на массу тела последней (и для удобства восприятия умноженное на 10 000) мы назвали «индексом ядоотдачи». Этот индекс показывает выход ядовитого секрета на единицу массы тела.

Результаты расчетов средних значений данного индекса для самцов и самок восточной степной гадюки из Саратовской области в разное время сезона активности 2015 г. приведены в табл. 2 и на рис. 1, б. Сравнивая самцов и самок по значениям индекса ядоотдачи вместо абсолютных значений выхода яда, мы получаем относительно меньшие половые различия. Это свидетельствует в пользу того, что в природных популяциях самцы и самки восточной степной гадюки с одинаковой массой тела в одно и то же время сезона продуцируют примерно одинаковое количество ядовитого секрета (Маленёв и др., 2015).

Характер сезонной динамики индекса ядоотдачи в выборках такой же, как и у абсолютных

значений ядоотдачи: от весны к лету он возрастает, а от лета к осени снова снижается. Выход яда на единицу массы тела и у самцов, и у самок восточной степной гадюки летом увеличивается. Относительные изменения индекса на наших выборках в большинстве случаев мало различаются с изменениями ядоотдачи.

Сезонные изменения абсолютных значений ядоотдачи и индекса ядоотдачи, подобные полученным на взрослых гадюках из природы, выявлены при длительном искусственном содержании восточных степных гадюк, родившихся в неволе (рис. 2). Даже при содержании в искусственных условиях у молодых гадюк отмечено увеличение ядоотдачи от весны к лету и последующее снижение осенью. При этом ядоотдача росла от 2014 к 2016 г., что связано с увеличением массы тела в ходе роста молоди, а индекс ядоотдачи оставался на одном уровне, повышаясь каждой весной и снижаясь в конце каждого лета.

Приведенные данные убедительно доказывают наличие у восточной степной гадюки сезонных изменений абсолютной ядоотдачи и индекса ядоотдачи в течение сезона активности: после выхода из зимовки значения этих показателей возрастают и перед уходом на зимовку снижаются.

Токсичность яда. В объединенных образцах яда самцов и объединенных образцах яда самок, собранных в разное время сезона активности 2015 г., мы определили значения среднесмертельной дозы LD_{50} для банановых сверчков. Сверчки были выбраны по той причине, что прямокрылые насекомые являются значительным компонентом питания восточных степных гадюк. Результаты токсикометрии приведены в табл. 3.

Токсичность яда и у самцов, и у самок несколько снижается (LD_{50} повышается) в августе по сравнению с маем и июлем, но статистически значимых сезонных различий в значениях LD_{50} ни у

Таблица 2
Индекс ядоотдачи взрослых гадюк в 2015 г.

Месяц	Пол	Средняя ядоотдача, мг	Средняя масса тела, г	Индекс ядоотдачи, отн. ед.
Май	Самцы	9.0	28.8	3.1
	Самки	24.6	50.5	4.9
Июнь	Самцы	15.9	29.4	5.4
	Самки	26.4	56.4	4.7
Август	Самцы	7.1	26.6	2.7
	Самки	12.1	32.3	3.8

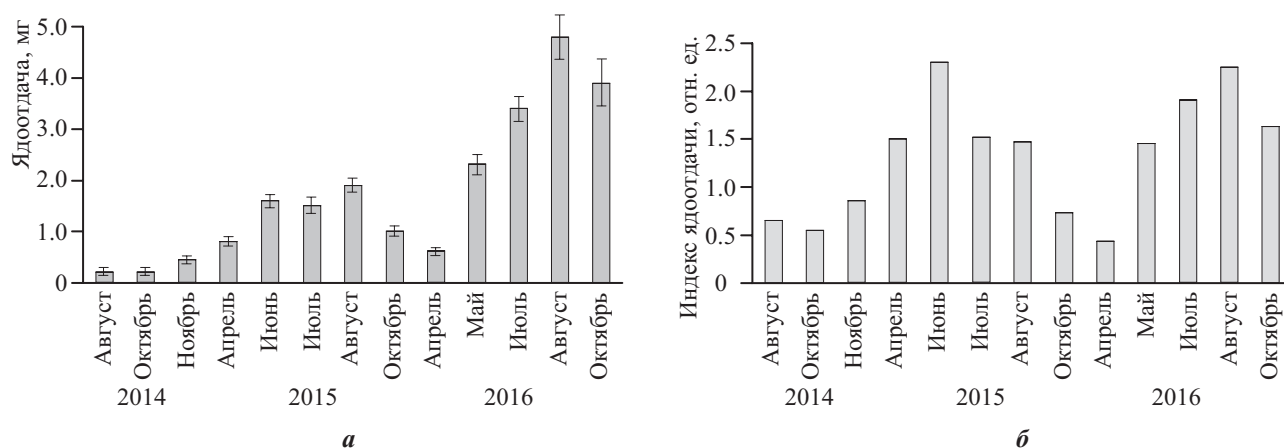


Рис. 2. Ядоотдача (а) и индекс ядоотдачи (б) молодых восточных степных гадюк при террариумном содержании в 2014 – 2016 гг.

тех, ни у других мы не выявили. Не исключено, что некоторое снижение токсичности (как и уменьшение ядоотдачи) связано со снижением общего уровня метаболических процессов у змей перед периодом зимнего покоя. Значимые половые различия ЛД₅₀ не выявлены ни в один период сезона 2015 г.

Таблица 3

Значения среднесмертельной дозы (ЛД₅₀, мкг/г) образцов яда восточной степной гадюки для банановых сверчков

Пол гадюк	Месяц 2015 г.		
	Май	Июнь	Август
Самцы	25.9±5.24	26.8±4.44	31.6±8.26
Самки	26.2±3.84	28.9±4.09	37.9±9.37

Различия в токсичности ядовитого секрета между самцами и самками у восточной степной и обыкновенной гадюк не были отмечены нами на мышах, банановых и домашних сверчках (Маленёв и др., 2007; Бакиев и др., 2015; Горелов, Маленёв, 2016 а, б). Возможно, отсутствие половых различий в токсичности ядовитого секрета гадюковых змей носит более общий характер и свидетельствует об одинаковой токсичности ядовитого секре-

та самцов и самок для одного и того же пищевого объекта.

Активности ферментов в яде. Мы проанализировали активности протеаз и оксидазы L-аминокислот в индивидуальных образцах яда *V. renardi*, собранных в разное время сезона активности 2015 г. (табл. 4).

Нам не удалось выявить значимых сезонных различий активности протеолитических ферментов ни у самцов, ни у самок. Значимые половые различия в протеолитической активности также не выявлены. Получается, что в течение всего сезона самцы и самки продуцируют яд с одинаковой активностью протеаз.

Тот же вывод касается и активности оксидазы L-аминокислот. Следует заметить, что большинство образцов (94.4%) из общей выборки яда взрослых гадюк ($n = 71$) были бесцветными, и в них активность оксидазы L-аминокислот не обнаруживалась. Отличные от нуля значения активности этого фермента объясняются тем, что в мае было отмечено 2 образца желтого цвета среди 13 образцов яда самцов, в августе – 1 из 8 у самцов и 1 из 15 у самок. На наш взгляд, сезонное распределение образцов по цвету в выборках – процесс достаточно случайный.

Таблица 4

Активности ферментов в образцах яда восточной степной гадюки

Месяц 2015 г.	Пол гадюк	n	Протеолитические ферменты, мкг тир / мг белка мин		Оксидаза L-аминокислот, Е / мг белка мин	
			lim	M±m	lim	M±m
Май	Самцы	13	78.4–116.9	92.8±3.49	0–5.7	0.6±0.46
	Самки	9	68.4–110.5	97.5±4.18	0	0
Июнь	Самцы	12	80.2–109.9	91.4±3.16	0	0
	Самки	14	67.9–99.6	87.5±2.53	0	0
Август	Самцы	8	82.7–100.6	89.2±2.41	0–1.9	0.2±0.23
	Самки	15	84.7–106.9	94.2±1.71	0–6.4	0.4±0.42

Таким образом, результаты проведенных экспериментальных исследований говорят о том, что некоторые свойства ядовитого секрета восточной степной гадюки (токсичность для насекомых, активности протеолитических ферментов и оксидазы L-аминокислот) на протяжении исследованных периодов сезона активности остаются практически постоянными. В то же время в ядоотдаче у гадюк обнаруживаются явные сезонные изменения – от весны к лету выход яда (как в абсолютном выражении, так и в пересчете на единицу массы змеи) возрастает, а к осени снижается.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бакиев А. Г., Гаранин В. И., Павлов А. В., Шуршина И. В., Маленев А. Л. 2008. Восточная степная гадюка *Vipera renardi* (Reptilia, Viperidae) в Волжском бассейне : материалы по биологии, экологии и токсинологии // Бюл. «Самарская Лука». Т. 17, № 4. С. 817 – 845.
- Бакиев А. Г., Маленев А. Л., Зайцева О. В., Шуршина И. В. 2009. Змеи Самарской области. Тольятти : Кассандра. 170 с.
- Бакиев А. Г., Гаранин В. И., Гелашивили Д. Б., Горелов Р. А., Доронин И. В., Зайцева О. В., Зиненко А. И., Клёнина А. А., Макарова Т. Н., Маленев А. Л., Павлов А. В., Петрова И. В., Ратников В. Ю., Старков В. Г., Ширяева И. В., Юсупов Р. Х., Яковлева Т. И. 2015. Гадюки (Reptilia : Serpentes : Viperidae : *Vipera*) Волжского бассейна. Тольятти : Кассандра. Ч. 1. 234 с.
- Беленький М. Л. 1963. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л. : Медгиз. 152 с.
- Гелашивили Д. Б., Безель В. С., Романова Е. Б., Силкин А. А., Нижегородцев А. А. 2016. Принципы и методы экологической токсикологии. Н. Новгород : Изд-во Нижегород. гос. ун-та. 702 с.
- Гелашивили Д. Б., Крылов В. Н., Романова Е. Б. 2015. Зоотоксикология : биоэкологические и биомедицинские аспекты : учеб. пособие. Н. Новгород : Изд-во Нижегород. гос. ун-та. 770 с.
- Горелов Р. А. 2015. Размерные, половые и сезонные особенности ядоотдачи обыкновенных гадюк // Экологический сборник 5 : тр. молодых ученых Поволжья. междунар. науч. конф. Тольятти : Кассандра. С. 102 – 106.
- Горелов Р. А., Маленев А. Л. 2016 а. Токсичность яда гадюк Волжского бассейна для насекомых // Самарская Лука : проблемы региональной и глобальной экологии. Т. 25, № 3. С. 155 – 161.
- Горелов Р. А., Маленев А. Л. 2016 б. Токсичность ядовитого секрета гадюки Ренара (*Vipera renardi*) из Волгоградской области // Чтения имени эколога и зоолога, профессора Виктора Алексеевича Попова : материалы докл. XXV – XXVII чтений. Казань : Фолиант. С. 45 – 49.
- Маленев А. Л., Бакиев А. Г., Зайцева О. В., Шуршина И. В. 2007. Токсичность яда обыкновенных гадюк из различных пунктов ареала // Изв. Самар. науч. центра РАН. Т. 9, № 1. С. 259 – 261.
- Маленев А. Л., Горелов Р. А., Макарова Т. Н. 2015. Ядоотдача обыкновенной *Vipera berus* и восточной степной *V. renardi* гадюк из Поволжья // Изв. Самар. науч. центра РАН. Т. 17, № 4 (4). С. 681 – 685.
- Маленев А. Л., Макарова Т. Н., Горелов Р. А. 2014. Особенности ядовитого секрета гадюки Ренара (*Vipera renardi*) из Волгоградской области // Изв. Самар. науч. центра РАН. Т. 16, № 1. С. 261 – 265.
- Орлов Б. Н., Гелашивили Д. Б., Ибрагимов А. К. 1990. Ядовитые животные и растения СССР. М. : Высш. шк. 272 с.
- Орлов Б. Н., Гелашивили Д. Б., Ушаков В. А. 1982. Ядовитые позвоночные животные и их яды : учеб. пособие. Горький : Изд-во Горьк. гос. ун-та. 92 с.
- Раявээ О. 1963. К фармакологии препарата из яда *Vipera ursinii renardi* // Учен. зап. Тартуского гос. ун-та. Вып. 143. Тр. по медицине VIII. С. 184 – 188.
- Ширяева И. В. 2011. Восточная степная гадюка *Vipera renardi* в Волжском бассейне : морфология, распространение, термобиология, питание, свойства яда : дис. ... канд. биол. наук. Тольятти. 151 с.
- Шуршина И. В. 2009. Изучение внутривидовой изменчивости свойств яда восточной степной гадюки *Vipera renardi* в Волжском бассейне // Экологический сборник 2 : тр. молодых ученых Поволжья / Ин-т экологии Волжского бассейна РАН. Тольятти : Кассандра. С. 208 – 213.
- Яд гадюки степной сухой. 1998. Временная фармакопейная статья : ВФС 42-3025-98. М. 23 с.
- Яды змеиные сухие : Технические условия ТУ 210 РСФСР 40-77. 1977. М. 9 с.
- Lowry O. H., Rosebrough H. S., Farr A. L., Randall R. I. 1951. Protein measurement with the FenolFolin reagent // J. of Biological Chemistry. Vol. 193, № 1. P. 265 – 275.
- Murata Y., Satake M., Suzuki T. 1963. Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms // J. Biochemistry. Vol. 53, № 6. P. 431 – 437.
- Starkov V. G., Osipov A. V., Utkin Y. N. 2007. Toxicity of venoms from vipers of *Pelias* group to crickets *Gryllus assimilis* and its relation to snake entomophagy // Toxicon. Vol. 49, № 7. P. 995 – 1001.
- Wellner D., Lichtenberg L. A. 1966. Assay of amino acid oxidase // J. Biochemistry. Vol. 5, № 1585. P. 593 – 596.
- Wellner D., Meister A. 1960. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus* // J. of Biological Chemistry. Vol. 235, № 7. P. 2013 – 2018.

А. Л. Маленёв, Р. А. Горелов, Т. Н. Атышева, А. Г. Бакиев

**VENOM'S YIELD AND VENOM'S PROPERTIES
OF EASTERN STEPPE VIPER *VIPERA RENARDI*
AT DIFFERENT TIMES OF ITS SEASONAL ACTIVITY**

A. L. Malenyov, R. A. Gorelov, T. N. Atyasheva, and A. G. Bakiev

*Institute of Ecology of the Volga River Basin, Russian Academy of Sciences
10 Komzin Str., Togliatti 445003, Russia
E-mail: malenyov@mail.ru*

The venom yield of the eastern steppe viper *Vipera renardi* (Christoph, 1861) was shown to be higher in the summer than in the spring and autumn. No seasonal variability of the venom toxicity (the average lethal dose DL_{50} for banana crickets *Gryllus locorojo* Weissman et Gray, 2012) and the enzyme activities therein (proteases and L-amino acid oxidase) was detected.

Key words: *Vipera renardi*, venom, venom yield, average lethal dose DL_{50} , banana crickets, proteases, L-amino acid oxidase.