

УДК 597.6+598.1

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЯДА ОБЫКНОВЕННЫХ ГАДЮК ИЗ НЕКОТОРЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РОССИИ И УКРАИНЫ

© 2007 А.Л. Маленев, А.Г. Бакиев, И.В. Шуршина, О.В. Зайцева¹, А.И. Зиненко²

¹Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

²Музей природы Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина, г. Харьков

Приведены результаты определения протеолитической активности (ПА) в образцах яда обыкновенной гадюки *Vipera berus*, полученных из разных популяций в европейской части Российской Федерации и в Украине. Максимальное среднее значение ПА (28,0 мкг тирозина/мг белка • мин.) отмечено в Майнском районе Ульяновской области России, минимальное (2,6) – в Змиевском районе Харьковской области Украины. В одной и той же популяции (Кондольский район Пензенской области, Россия) выявлено статистически достоверное различие ПА образцов яда – желтого цвета (10,5 мкг тирозина/мг белка • мин.) и бесцветного (7,8). В большинстве случаев бесцветный ядовитый секрет с низкими значениями ПА собран в популяциях, определенных как гадюка Никольского *V. b. nikolskii*. Высказано предположение, что ПА ядовитого секрета может служить дополнительным диагностическим признаком подвидов *V. b. berus* и *V. b. nikolskii*.

Введение

Исследование внутривидовой изменчивости свойств змеиных ядов имеет теоретическое значение в плане установления причин и пределов варибельности биохимических параметров ядовитого секрета. Изменчивость свойств ядов необходимо учитывать при производстве эффективных антисывороток и лекарственных препаратов на основе змеиных ядов.

Обыкновенная гадюка *Vipera berus* на территории России и Украины представлена, согласно принятой нами точке зрения, двумя подвидами – номинативным *V. b. berus* и лесостепным, или гадюкой Никольского, *V. b. nikolskii*. В европейской части Российской Федерации и в Украине известны популяции, совмещающие признаки обоих подвидов [1, 2, 4, 9–11, 13].

Протеолитическая активность (ПА) яда обыкновенных гадюк, населяющих речной бассейн Волги, уже затрагивалась в наших ранее вышедших публикациях [3, 5–8]. Задачей настоящей работы является сравнительный анализ ПА яда обыкновенных гадюк из различных популяций в пределах ареалов номинативного и лесостепного подвидов на территории России и Украины.

Материалы и методы

Образцы яда от отловленных обыкновенных гадюк получали в лаборатории экологической токсикологии Института экологии Волжского бассейна РАН. Змей «доили» механическим способом в чашки Петри (диаметром 40 мм с низким бортиком). Ядовитый секрет сушили в стандартных условиях в эксикаторе над хлористым кальцием не менее 12 суток. Затем кристаллический яд собирали и анализировали. В некоторых случаях образцы яда были собраны и переданы для анализа нашими коллегами. Каждый образец представлял собой секрет ядовитых желез, собранный от одного или нескольких (до 10) экземпляров гадюк (разновозрастных и разнополых, но из одной популяции).

Определение ПА в образцах проводили, используя в качестве субстрата казеин [14]. Навеску сухого яда (0,6–0,8 мг) растворяли в физиологическом растворе и инкубировали 15–20 мин. при 37°C для полного растворения яда. Реакционная смесь состояла из 1 мл раствора яда и 1 мл 2% -го казеина в 0,4 М Tris-HCl буфере (pH = 8,2). Реакцию запускали добавлением субстрата и проводили 30 мин. при 37°C. Затем добавляли двойной объем 5%-ой охлажденной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), инкубировали 20–30 мин.

при комнатной температуре до полного формирования осадка и фильтровали. В фильтрате определяли количество гидролизованного субстрата, не осаждаемого ТХУ, по тирозину, окрашиваемому 0,5 N реактивом Фолина, колориметрически по поглощению при 670 нм. Удельную активность протеолитической (казеинолитической) активности рассчитывали как количество образовавшегося тирозина в мкг за 1 мин. в расчете на 1 мг белка (мкг тирозина/мг белка • мин.). Определение концентрации белка проводили по методу Лоури [12].

Статистический анализ результатов проводили общепринятыми методами. За объем выборки n принимали общее число определений ПА одного образца или нескольких образцов из определенного географического пункта. При вычислении средней арифметической M и ее ошибки m всем вариантам в выборочной совокупности n придавали равный «вес».

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментального определения ПА в образцах ядовитого секрета обыкновенных гадюк приведены в табл. 1. Как видно из таблицы, минимальное среднее значение ПА (2,6 мкг тирозина/мг белка • мин.) отмечено для образца из Змиевского района Харьковской области, которое на порядок ниже максимального среднего значения ПА (28,0), отмеченного для образца из Майнского района Ульяновской области. Важно подчеркнуть, что, судя по имеющимся данным о распространении подвидов обыкновенной гадюки [13], первый образец взят из ареала *V. b. nikolskii*, а второй – из зоны интерградации данного подвида с *V. b. berus*, либо из ареала *V. b. berus*. Яд гадюк, отловленных в Нижегородской области, которая отнесена к ареалу *V. b. berus*, также имеет высокие значения ПА (20,6). В целом же можно отметить, что наиболее «чистые» популяции гадюки Никольского имеют низкую ПА яда, а наиболее удаленные от них популяции номинативного подвида имеют высокую ПА.

Растянутый переход от минимальных значений ПА к максимальным свидетельствует

в пользу наличия широкой зоны интрогрессии, предположение о существовании которой было высказано после морфологического анализа [13, 15]. Переход от низких к высоким значениям ПА в общем происходит при продвижении с юга на север, но есть ряд исключений. К ним относится, к примеру, Тоншаевский район Нижегородской области и Майнский район Ульяновской области: первый находится севернее, но среднее значение ПА ниже.

По-видимому, значительная вариабельность ПА в яде обыкновенных гадюк из разных популяций обусловлена многими причинами – генетической вариабельностью признаков, историческими причинами, различиями в условиях местообитаний змей и т.д. Существенные различия в ПА образцов из близко расположенных географических пунктов могут быть связаны с труднопреодолимыми для гадюк преградами. Так, Самарская область находится в пределах контактной зоны подвидов *V. b. berus* и *V. b. nikolskii* [13]. Здесь в высшей степени статистически достоверные различия (0,1%-ый уровень значимости) ПА яда выявлены у гадюк из г. Самара (20,2 мкг тирозина/мг белка • мин.) и национального парка «Самарская Лука» (14,3). Расстояние по прямой между местами отлова в Самаре и национальном парке составляет менее 100 км. Однако названные пункты разделены широкой рекой так, что первый пункт находится на левом берегу Волги, а второй – на правом.

Любопытно, что ПА ядовитого секрета гадюк двух образцов разного цвета (желтого и бесцветного) в пределах одной популяции могут достоверно различаться. Нами установлено, что отдельно собранные в Кондольском районе Пензенской области России образцы яда, отличающиеся по цвету, имеют и статистически достоверные различия средних значений ПА: по сравнению с бесцветным ядом у желтого уровень ПА выше (табл. 2). Считается [13], что для номинативного подвида обыкновенной гадюки характерен желтый яд, а для гадюки Никольского – бесцветный. Популяция из Кондольского района Пензенской области, находящаяся на гра-

Таблица 1. Значение протеолитической активности (ПА) яда обыкновенных гадюк из разных популяций России и Украины

Регион	Район отлова	n	ПА, мкг тирозина/мг белка • мин.	
			lim	M±m
Самарская обл.*	г. Самара	15	14,6–26,1	20,2±0,85
	Ставропольский р-н, НП «Самарская Лука»	8	13,1–17,7	14,3±0,55
Нижегородская обл.*	Тоншаевский р-н	8	19,2–22,3	20,6±0,41
Ульяновская обл.*	Майнский р-н	5	24,2–31,3	28,0±1,33
Пермская обл.*	Кунгурский р-н	4	17,1–18,5	17,7±0,31
Республика Татарстан*	Лаишевский р-н	9	12,0–22,5	16,5±1,12
	Лениногорский р-н	5	14,8–21,2	18,3±1,16
	Зеленодольский р-н	4	21,9–27,7	23,7±1,35
	Азнакаевский р-н	5	13,6–19,8	17,3±1,10
Республика Мордовия*	Ковылкинский р-н	9	14,4–18,9	16,7±0,47
	Кочкуровский р-н	4	16,4–20,1	17,9±0,84
	Большеигнатовский р-н, НП «Смольный»	9	6,7–19,7	13,3±1,54
	Темниковский р-н	5	14,5–23,9	18,0±1,66
Республика Чувашия*	Алатырский р-н	5	19,7–23,9	22,4±0,78
Киевская обл.**	Бориспольский р-н	3	12,4–14,7	13,3±0,74
Черниговская обл.**	Ичнянский р-н	3	12,5–13,8	13,2±0,39
Пензенская обл.*	Кондольский р-н	9	6,4–11,5	9,3±0,56
Пензенская и Саратовская обл.*	Долина р. Хопер на границе Бековского и Тамалинского р-нов Пензенской обл. с Ртищевским р-ном Саратовской обл.	5	6,0–9,4	8,2±0,59
Саратовская обл.*	Аткарский р-н	4	7,4–8,0	7,8±0,13
Кировоградская обл.**	Знаменский р-н	4	6,5–8,3	7,2±0,42
Харьковская обл.**	Змиевский р-н	3	2,1–3,0	2,6±0,49

Примечание: * – Россия; ** – Украина.

Таблица 2. Значения ПА в образцах яда гадюк из Кондольского района Пензенской области

Цвет яда	n	ПА, мкг тирозина/мг белка • мин.		P
		lim	M±m	
Желтый	5	9,4–11,5	10,5 ± 0,41	< 0,001
Бесцветный	4	6,4–8,8	7,8 ± 0,54	

нице Волжского и Донского бассейнов, вероятно, относится к зоне интерградации двух подвидов. Данная популяция, по сравнению с другими популяциями из бассейна Волги, имеет более низкие средние значения ПА. Одна часть гадюк в этой популяции имеет яд желтого цвета, а другая – бесцветный.

Полученные нами данные о протеолитической активности подтверждают давно известный, но недостаточно освещенный в литературе факт отличия свойств яда номинативного и лесостепного подвидов обыкновенной

гадюки. Приведенные материалы позволяют предположить, что подвид *V. b. nikolskii* имеет в среднем более низкие значения ПА по сравнению с *V. b. berus* и гибридными популяциями. Низкий уровень ПА ядовитого секрета может использоваться для диагностики гадюки Никольского, которая имеет на территории России и Украины обширную зону интерградации с номинативным подвидом обыкновенной гадюки.

Важное значение для трактовки взаимоотношений *V. b. berus* и *V. b. nikolskii* представ-

ляет собой связь морфологии обыкновенных гадюк со свойствами их яда. Этому вопросу мы планируем посвятить специальные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Песков А.Н., Гриднев Д.В. Морфологическая характеристика гадюк из лесопарковой зоны г. Самара // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. Вып. 4. Тольятти, 2000.
2. Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Песков А.Н., Павлов А.В., Гриднев Д.В. К вопросу о видовом статусе гадюки Никольского // Вторая конференция герпетологов Поволжья: Тез. докл. Тольятти, 1999.
3. Зайцева О.В., Шуришина И.В., Маленев А.Л., Бакиев А.Г. Ферментативные активности яда обыкновенной гадюки из двух популяций Среднего Поволжья // Материалы науч. конф. «Татищевские чтения: актуальные проблемы науки и практики». Тольятти: ВУиТ им. В.Н. Татищева, 2007.
4. Зиненко А.И. Особенности морфологии *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) и *Vipera nikolskii* Vedmederja, Grubant et Rudaeva, 1986 – следствие интрогрессивной гибридизации? // Змеи Восточной Европы: Материалы междунар. конф. Тольятти, 2003.
5. Мурзаева С.В., Маленев А.Л., Бакиев А.Г. Различия в протеолитической активности яда обыкновенных гадюк из разных пунктов ареала // Первая конференция герпетологов Поволжья: Тез. докл. Тольятти, 1995.
6. Маленев А.Л., Бакиев А.Г., Шуришина И.В., Зайцева О.В. Протеолитическая активность нативного и сухого яда самцов и самок обыкновенной гадюки // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. Вып. 9. Тольятти, 2006.
7. Маленев А.Л., Зайцева О.В., Шуришина И.В., Наумкина Н.А., Павлов А.В. Токсичность и биохимические свойства яда обыкновенной гадюки *Vipera berus* из Республики Татарстан // Актуальные проблемы герпетологии и токсинологии: Сб. науч. тр. Вып. 9. Толь-

Благодарности

Мы признательны к.б.н. М.В. Пестову (Нижегород), В.Г. Старкову (Москва), к.б.н. А.В. Павлову и Н.А. Наумкиной (Казань) за любезно предоставленные образцы яда.

- яти, 2006.
8. Мурзаева С.В., Маленев А.Л., Бакиев А.Г. Протеолитическая активность яда гадюковых змей, содержащихся в неволе // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 4.
9. Павлов А.В., Гаранин В.И., Бакиев А.Г. Обыкновенная гадюка *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) // Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. Змеи Волжско-Камского края. Самара: Изд-во СамНИЦ РАН, 2004.
10. Песков А.Н., Бакиев А.Г., Маленев А.Л. *Vipera melanis* (Pallas, 1771): что за гадюки обитают в городской черте Самары? // Третья конференция герпетологов Поволжья: Материалы регион. конф. Тольятти, 2003.
11. Bakiev A.G., Buhme W., Joger U. *Vipera (Pelias) [berus] nikolskii* Vedmederya, Grubant und Rudaeva, 1986 – Waldsteppenotter // Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas. Band 3/PIB: Schlangen (Serpentes) III. Viperidae. Wiebelsheim: AULA-Verlag, 2005.
12. Lowry O.H., Rosebrough H.J., Farr A.L., Randall R.I. Protein measurement with the Folin reagent // J. of Biol. Chem. 1951. Vol. 193.
13. Milto K.D., Zinenko O.I. Distribution and Morphological Variability of *Vipera berus* in Eastern Europe // Herpetologia Petropolitana: Proc. of the 12th Ordinary General Meeting of the Soc. Europaea Herpetol. St. Petersburg, 2005.
14. Murata Y., Satake M., Suzuki T. Studies on snake venom. XII. Distribution of proteinase activities among Japanese and Formosan snake venoms // J. Biochem. 1963. Vol. 53, № 6.
15. Zinenko O.I. New data about hybridization between *Vipera nikolskii* Vedmederya, Grubant et Rudaeva, 1986 and *Vipera berus berus* (Linnaeus, 1758) and their contact zones in Ukraine // Mertensiella / Verbreitung, Okologie und Schutz der Kreuzotter (*Vipera berus* [Linnaeus, 1758]). 2004. N. 15.

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF COMMON VIPER'S VENOM FROM SOME POPULATIONS IN RUSSIA AND UKRAINE

© 2007 A.L. Malenyov, A.G. Bakiev, I.V. Shurshina, O.V. Zaitseva¹, A.I. Zinenko²

¹The Institute of Ecology of Volga River Basin RAS, Togliatty, Russia

²The Museum of Nature of Kharkov National University
named for V.N. Karazin, Kharkov, Ukraine

Here the results of determination of proteolytic activity (PA) in common viper *Vipera berus* venom samples received from different populations in European part of Russia and Ukraine are given. The maximum average of PA (28,0 µg of tyrosine / mg of protein·min) has been registered in Maynskiy district of Uljanovsk region, Russia; the minimum one (2,6) – in Zmieviskiy district of Kharkov region, Ukraine. The reliable distinction of PA of venom samples – of yellow color (10,5 µg of tyrosine / mg of protein·minute) and of colorless (7,8) – has been statistically recognized in the same population (Kondolskiy district of Penza region, Russia). In most cases the colorless venom with low PA level has been gathered in populations defined as Nikolskiy's viper *V. b. nikolskii*. It was supposed that PA level of venomous secret can be the additional diagnostic characteristic of *V. b. berus* and of *V. b. nikolskii* subspecies.