

УДК 598.115.33:591.145.3

## ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ ЯДА ВОСТОЧНОЙ СТЕПНОЙ ГАДЮКИ ДЛЯ СВЕРЧКОВ: НЕКОТОРЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ИМЕЮЩИЕ МЕТОДИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

© 2016 А.Л. Маленёв, Р.А. Горелов, Т.Н. Атяшева, А.Г. Бакиев

Институт экологии Волжского бассейна РАН, г. Тольятти

Статья поступила в редакцию 19.05.2016

Приведены результаты определения среднесмертельной дозы (ЛД<sub>50</sub>) яда восточной степной гадюки *Vipera renardi* на двух видах прямокрылых насекомых – домовом сверчке *Acheta domesticus* и банановом сверчке *Gryllus assimilis*. У домовых сверчков выявлена сезонная изменчивость устойчивости к яду, которая снижается зимой. У банановых сверчков направленной сезонной изменчивости ЛД<sub>50</sub> не обнаружено, а также не выявлены статистически значимые различия ЛД<sub>50</sub> в зависимости от пола насекомых. Показано, что у двух видов сверчков отсутствует видоспецифичность реакции на яд гадюк. **Ключевые слова:** восточная степная гадюка *Vipera renardi*, ядовитый секрет, среднесмертельная доза ЛД<sub>50</sub>, домовый сверчок *Acheta domesticus*, банановый сверчок *Gryllus assimilis*.

### ВВЕДЕНИЕ

Важной составляющей пищевого рациона восточной степной гадюки (гадюки Ренара) *Vipera renardi*, являются прямокрылые насекомые (отряд Orthoptera) [1, 3, 4, 9]. Доля прямокрылых в рационе змей данного вида велика летом и осенью [2, 10].

Для нескольких видов гадюк подрода *Pelias* была установлена взаимосвязь токсичности ядовитого секрета гадюк с энтомофагией – чем выше процент насекомых в рационе данного вида гадюк, тем токсичнее для банановых сверчков ядовитый секрет [11]. Эти результаты подтверждаются и нашими данными по токсикометрии ядов гадюк Волжского бассейна на сверчках: яд восточной степной гадюки имеет более низкие значения ЛД<sub>50</sub> по сравнению с обыкновенной гадюкой [7]. По нашим данным, яд новорожденных гадюк Ренара отличается от яда взрослых особей более высокой токсичностью по отношению к домовым сверчкам [8].

В вышеупомянутых и других доступных публикациях не отмечен ряд методических особенностей при токсикометрии ядов гадюк на насекомых, в частности, сезонная специфичность воздействия ядовитого секрета на прямокрылых, различия в чувствительности самцов и самок сверчков к яду, а также различия в значениях ЛД<sub>50</sub>, полученных в экспериментах на разных видах насекомых.

*Маленёв Андрей Львович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией. E-mail: malenyov@mail.ru*

*Горелов Роман Андреевич, аспирант. E-mail: gorelov.roman@mail.ru*

*Атяшева Татьяна Николаевна, инженер-исследователь. E-mail: Tatyana.Atyasheva@mail.ru*

*Бакиев Андрей Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник. E-mail: herpetology@list.ru*

Цель настоящей статьи – проанализировать некоторые результаты определения ЛД<sub>50</sub> яда гадюк на сверчках, которые необходимо учитывать при планировании и проведении токсикометрических экспериментов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Экспериментальные животные.** Исследования токсичности яда *V. renardi* проводили на культурах домовых *Acheta domesticus* и банановых *Gryllus assimilis* сверчков, которых разводили и выращивали в лаборатории в сухом термостатируемом помещении при температуре 26–28°C и относительной влажности 25–35%. Условия содержания и разведения были примерно одинаковые, с теми отличиями, что культура банановых сверчков требует более высокой температуры и влажности, которые регулировали мощностью точечного источника тепла внутри контейнера и размерами поилки.

Сверчков содержали и разводили в пластиковых контейнерах 60×40×40 см. Кормом служили сухая смесь (молотые овсяные хлопья, сухое молоко, сухой гаммарус) и свежие овощи (морковь, салат). Один раз в неделю в корм сверчкам добавляли мелкорубленое вареное яйцо. В качестве поилки использовали пластиковую чашку Петри с губкой, смоченной водой.

В работе использовали сверчков обоих видов на стадии предимаго: для домовых сверчков формировали группы массой 0,30–0,40 г, для банановых – 0,50–0,59, 0,60–0,69 и 0,70–0,79 г. Для расчета эффективных доз яда применяли среднюю массу сверчков в группе.

**Ядовитый секрет гадюк.** В экспериментах использовали образцы ядовитого секрета номинативного подвида гадюк Ренара *V. r. renardi*, отловленных в мае 2013 г. в окрестностях с. Верхняя

Добринка Камышинского района Волгоградской области. Отбор ядовитого секрета у гадюк проводили в лаборатории механическим способом, массируя пальцами ядовитые железы. Выбор этих образцов обусловлен тем, что из данной выборки гадюк было получено 20 индивидуальных образцов ядовитого секрета, и яда было достаточно для проведения не только биохимических анализов, но и токсикологических экспериментов по определению ЛД<sub>50</sub> [8]. После ядоотбора гадюки были выпущены в места отлова.

**Токсикометрия.** Для определения ЛД<sub>50</sub> ядов гадюк использовали свежеприготовленные водные растворы яда в концентрации 2,0 мг/мл. Инъекции растворов ядов насекомым проводили микрошприцом (объем 1-30 мкл) внутривентриально: домовым сверчкам раствор яда вводили в нижнюю половину брюшка с дорзальной стороны, банановым – в правую нижнюю четверть брюшка. Эти различия в местах инъекций обусловлены исключительно физическими размерами этих насекомых. Для определения значения ЛД<sub>50</sub> одного образца яда использовали 25-35 сверчков одной весовой группы: 5-7 эффективных доз по 5 сверчков в каждой. При определении ЛД<sub>50</sub> ядовитого секрета проверяли диапазон доз от 2,0 до 60,0 мкг/г. В день проведения острого опыта сверчков не кормили и убирали поилку. Контейнеры со сверчками после инъекций яда инкубировали также при температуре 26,0-28,0°C в течение 24 часов, после чего острый опыт прекращали, фиксируя количество мертвых и выживших насекомых. Значения ЛД<sub>50</sub> рассчитывали методом модифицированного пробит-анализа [5, 6]. Определение среднесмертельной дозы одного образца яда проводили не менее чем в двух независимых экспериментах, и ниже в статье приведены средние по результатам двух экспериментов значения ЛД<sub>50</sub>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Сезонные изменения устойчивости сверчков к действию яда.** При определении токсичности индивидуальных образцов яда ренаровых гадюк было отмечено, что на разных поколениях домовых сверчков *Acheta domesticus* для одних и тех же индивидуальных образцов ядовитого секрета значения среднесмертельных доз ЛД<sub>50</sub> отличались (табл. 1,

рисунок). Снижение абсолютных значений ЛД<sub>50</sub> с июля 2013 г. по январь 2014 г. может быть вызвано разными причинами – либо происходит «вырождение» культуры сверчков из-за близкородственного скрещивания, либо у сверчков в течение сезона меняется устойчивость к яду. Для уточнения причины мы продолжили наши наблюдения и определили ЛД<sub>50</sub> тех же образцов яда на следующих поколениях сверчков, выведенных весной и летом 2014 г.

В данной серии экспериментов лимитирующим фактором было наличие сверчков в некоторых поколениях, чем и определялось разное количество проанализированных образцов. Половозрелых сверчков из каждого поколения использовали в качестве производителей для выведения последующего поколения. Здесь же необходимо уточнить, что в табл. 1 и на рисунке указаны месяцы, когда проводили эксперименты со сверчками, а не сроки их выведения. В опытах использовали сверчков возрастом примерно в 1,5 месяца. Таким образом, мы проанализировали 6 поколений сверчков, полученных в 2013-2014 гг.

В разные сезоны 2013-2014 гг. реакция сверчков на одни и те же образцы яда оказалась различной. Минимальные значения ЛД<sub>50</sub> отмечены в 2014 г. у «зимнего» поколения домовых сверчков, а определенные летом 2014 г. (июнь и август) значения ЛД<sub>50</sub> яда практически вернулись к прежним, отмеченным летом и осенью 2013 г. Это позволило нам исключить предположение о возможном вырождении лабораторной культуры сверчков из-за длительного близкородственного скрещивания.

Полученные результаты говорят, скорее всего, о том, что домовые сверчки по-разному реагируют на яд гадюк в разное время года, что необходимо учитывать при проведении токсикологических экспериментов на этом виде насекомых. Вполне вероятно, изменение устойчивости к яду объясняется сезонными перестройками в метаболизме сверчков.

При работе с культурой другого вида сверчков – банановых *Gryllus assimilis* – направленных сезонных отличий нами обнаружено не было. На имеющихся данных, полученных при воздействии одного и того же образца яда на насекомых разных поколений, не выявлены статистически

**Таблица 1.** ЛД<sub>50</sub> образцов яда восточной степной гадюки для домовых сверчков

ЛД <sub>50</sub> , мкг/г	Время определения ЛД <sub>50</sub>					
	Июль 2013 г.	Октябрь 2013 г.	Январь 2014 г.	Март 2014 г.	Июнь 2014 г.	Август 2014 г.
min	10,2±2,88	10,7±3,04	1,7±0,47	6,3±1,77	10,1±2,89	17,1±4,84
max	51,3±10,16	37,5±6,67	14,2±4,01	27,6±7,81	26,8±3,24	23,4±6,63
средние	24,7±2,02	21,0±2,42	6,6±0,79	11,2±1,29	16,9±1,20	20,7±0,63
n	20	12	20	17	16	9

Примечание: n – количество определений ЛД<sub>50</sub> в 20 индивидуальных образцах ядовитого секрета.

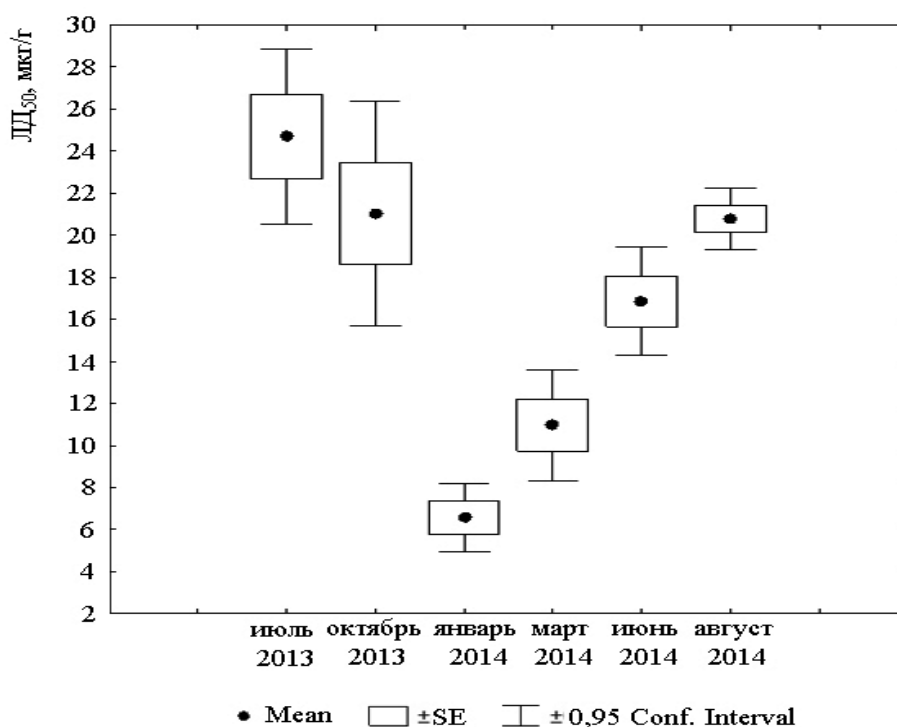


Рис. Значения ЛД<sub>50</sub>, полученные на разных поколениях домовых сверчков (июль 2013 г. – август 2014 г.)

значимые различия в их устойчивости к яду. Так, значения ЛД<sub>50</sub> одного и того же образца яда восточной степной гадюки оказались следующими: 22,5±3,51 мкг/г (дата эксперимента 21.11.2014 г.) и 22,7±4,56 мкг/г (дата эксперимента 12.05.2015 г.).

**Видоспецифичность действия ядовитого секрета на сверчков.** Целью данной серии экспериментов было сравнение устойчивости разных видов сверчков к яду *V. renardi*. Для этого мы определили значения ЛД<sub>50</sub> одного и того же образца яда на двух видах сверчков (домовых *Acheta domesticus* и банановых *Gryllus assimilis*), масса которых у обоих видов была одинаковая (0,30-0,39 г). Как видно из данных табл. 2, разница в значениях ЛД<sub>50</sub> является статистически незначимой, что говорит в пользу отсутствия видоспецифичности воздействия яда Ренаровых гадюк на эти виды сверчков. При этом мы не исключаем такой возможности, что на других видах прямокрылых, используемых гадюками в качестве объектов питания, могут быть получены иные значения среднесмертельных доз.

**Половые различия в устойчивости сверчков к яду гадюк.** В этой серии экспериментов мы провели определение величины ЛД<sub>50</sub> яда гадюк Ренара на разнополых банановых сверчках мас-

сой 0,70-0,79 г. При такой массе сверчки уже легко дифференцировались по полу – самки от самцов отличались наличием выраженного яйцеклада. Как видно из данных табл. 3, для одного и того же образца яда на выборках самцов и самок сверчков были получены одинаковые значения ЛД<sub>50</sub>, т.е. в наших экспериментальных условиях половые различия в реакции насекомых на яд гадюк не были обнаружены. Этот вывод имел практическое значение и позволил в дальнейшем проводить токсикометрию на выборках сверчков, включающих как самцов, так и самок.

Проведенные эксперименты по определению ЛД<sub>50</sub> яда гадюк Ренара на сверчках позволяют сделать следующие обобщения, имеющие методическое значение при проведении токсикометрических исследований на насекомых. Во-первых, разные поколения домовых сверчков, полученные в течение года, по-разному реагируют на яд гадюк, снижая устойчивость к нему в зимнее время. Во-вторых, отмечено отсутствие статистически значимых различий в реакции двух видов сверчков на яд гадюк. В-третьих, между значениями ЛД<sub>50</sub>, полученными на самцах и самках банановых сверчков, не выявлено статистически значимых различий.

Таблица 2. Видоспецифичность действия яда гадюк на разные виды сверчков

Вид сверчков	ЛД <sub>50</sub> , мкг/г	t <sub>φ</sub>	P
домовые <i>Acheta domesticus</i>	20,1±3,19	0,544	>0,05
банановые <i>Gryllus assimilis</i>	22,4±2,80		

Примечание: в опыте использовали 7 групп сверчков по 5 шт. в каждой; проанализировали следующие дозы яда – 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0 мкг/г.

**Таблица 3.** Значения  $LD_{50}$  яда гадюк, полученные на самцах и самках банановых сверчков

пол сверчков	$LD_{50}$ , мкг/г	$t_{\phi}$	$P$
самцы	21,4±1,98	0,108	>0,05
самки	21,0±3,01		

Примечание: в опыте использовали 5 групп насекомых по 5 шт. в каждой; проанализировали следующие дозы яда – 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 мкг/г.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Павлов А.В., Шуришина И.В., Маленев А.Л. Восточная степная гадюка *Vipera renardi* (Reptilia, Viperidae) в Волжском бассейне: материалы по биологии, экологии и токсикологии // Бюл. «Самарская Лука». 2008. Т. 17, № 4. С. 817-845.
2. Бакиев А.Г., Литвинов Н.А., Шуришина И.В. О питании восточной степной гадюки *Vipera renardi* (Christoph, 1861) в Волжском бассейне // Современная герпетология. 2010. Т. 10, вып. 1/2. С. 54-56.
3. Бакиев А.Г., Маленев А.Л., Зайцева О.В., Шуришина И.В. Змеи Самарской области. Тольятти: ООО «Кассандра», 2009. 170 с.
4. Бакиев А.Г., Павлов А.В., Старков В.Г. и др. Морфологические характеристики, систематика, распространение, станции и обилие, сезонная и суточная активность, размножение, линька, продолжительность жизни, питание // Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелашивили Д.Б. и др. Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: *Vipera*) Волжского бассейна. Часть 1. Тольятти: Кассандра, 2015. С. 103-136.
5. 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. С. 388-441.
6. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963. 152 с.
7. Маленев А.Л., Горелов Р.А., Макарова Т.Н. и др. Токсикологическая характеристика ядовитого секрета гадюк // Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Гелашивили Д.Б. и др. Гадюки (Reptilia: Serpentes: Viperidae: *Vipera*) Волжского бассейна. Часть 1. Тольятти: Кассандра, 2015. С. 156-194.
8. Маленев 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.
9. Павлов А.В., Петрова И.В., Кармазина И.О. Прямокрылые (Orthoptera) в питании восточной степной гадюки // Вопросы герпетологии. Материалы IV съезда Герпетологического о-ва им. А.М. Никольского. СПб.: Русская коллекция, 2011. С. 208-212.
10. Шляхтин Г.В., Табачишин В.Г., Завьялов Е.В., Табачишина И.Е. Амфибии и рептилии: Учебное пособие / Животный мир Саратовской области. Кн. 4. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2005. 116 с.
11. 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. Vol. 49. P. 995-1001.

### SHORT-TERM TOXICITY OF EAST STEPPE VIPER VENOM FOR CRICKETS: FEW RESULTS HAVING METHODOLOGICAL VALUE

© 2016 A.L. Malenyov, R.A. Gorelov, T.N. Atyasheva, A.G. Bakiev

Institute of Ecology of Volga river Basin of Russian Academy of Science, Togliatti

The article shows the definition results of average lethal dose ( $LD_{50}$ ) of east steppe viper *Vipera renardi* venom on two species of orthopteran insects: house cricket *Acheta domesticus* and banana cricket *Gryllus assimilis*. The seasonal variability of resistance to venom, which decreases in winter, has been revealed at house crickets. Banana crickets don't have the directed seasonal variability of  $LD_{50}$ . Also the statistically significant differences of  $LD_{50}$  depended on sex of insects have not been revealed. It is shown that two species of crickets have no species-specificity of reaction on vipers' venom.

**Keywords:** east steppe viper *Vipera renardi*, snake venom, average lethal dose  $LD_{50}$ , house cricket *Acheta domesticus*, banana cricket *Gryllus assimilis*.

Andrey Malenyov, Candidate of Biology, Head of Laboratory.

E-mail: malenyov@mail.ru

Roman Gorelov, Graduate Student.

E-mail: gorelov.roman@mail.ru

Tatyana Atyasheva, Research Engineer. E-mail: Tatyana.Atyasheva@mail.ru

Andrey Bakiev, Candidate of Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow. E-mail: herpetology@list.ru