АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ИНСТИТУТ ЗООЛОГИИ

На правах рукописи
УДК 591.576.42:577.35.

РЕЙМБАЕВА РОЗА САПАРБАЕВНА

МОРФО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛОЗОВ: *COLUBER* И *ELAPHE*, МЕМБРАНОАКТИВНОСТЬ ИХ ЯДОВ

03.00.08 - Зоология, 03.00.13 - Физиология человека и животных

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Ташкент - 2012

Работа выполнена в Институте зоологии Академии наук Республики Узбекистан

Научный руководитель: доктор биологических наук
Казаков Ибрагим Кадырович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Садыков Боходир Асларович

кандидат биологических наук
Чикин Юрий Антонович

Ведущая организация: Национальный университет Узбекистана имени Мирзо Улугбека

Защита состоится "___" _____2012 г. в __ часов на заседании разового Специализированного совета Д.015.10.01 (решение Президиума ВАК РУз) при Институте зоологии АН Республики Узбекистан по адресу: 100095, Ташкент, ул. Ниязова, 1, Телефон: (99871) 2460718, факс: (99871)1206791. E-mail: zool_uz@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института зоологии АН Республики Узбекистан

Автореферат разослан "_____"_____2012 г.

Ученый секретарь
Специализированного совета,
кандидат биологических наук Арипова Ф.Х.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Сохранение разнообразия животного мира в конкретных регионах с каждым годом становится всё более актуальной задачей, поскольку освоение территории и интенсивное её использование, деградации мест обитания приводит к резкому сокращению численности многих видов животных. В этом плане, особое значение приобретает изучение змей различных экологических групп в конкретных зонах.

По современным представлениям змеи представлены 297 родами и 1803 видами (Дунаев, Орлова, 2003). Ужеобразные, в частности представители родов *Coluber* и *Elaphe*, изучены недостаточно. Очевидно, это связано с доминированием в сознании людей мнения о незначительной роли этих змей и их продуктов в экономической сфере и, как следствие такого отношения, отсутствуют сведения о составе и механизме действия ядов и их компонентов на биологические структуры, в том числе и на биомембраны. Это предполагает интеграции усилия специалистов различного профиля. Результаты таких исследований, отражающих морфо-биологические особенности полозов и механизмов действия ядов, представляют научно-практический интерес.

Рассматриваемые змеи родов *Coluber* и *Elaphe* достаточно распространены в биогеоценозах Узбекистана. Изучение морфо-биологических особенностей полозов и выяснение механизма действия ядов является актуальной задачей как зоологии, так и физиологии.

Степень изученности проблемы. Исследование ужеобразных змей Узбекистана проводились О.П.Богдановым (1956, 1960, 1965, 1992), Абубакировой (1997), Камиловой (2000), Казаковым (2011). Тем не менее, морфо-биологические особенности родов *Coluber* и *Elaphe* остались слабо изученными. Структурно-функциональные особенности яда ряда видов, рассматриваемых родов, изучены ещё недостаточно.

Связь диссертационной работы с тематическими планами НИР. Диссертационная работа выполнялась в соответствии с тематикой НИР Института зоологии АН РУз: «Изучение морфо-функциональных характеристик ядовитых желез заднебороздчатых змей и членистоногих, механизм токсического действия их зоотоксинов на организм животных» (№ Гос. регистрации 01.97.0005384, 1997-1998гг), «Биологическая роль и специфичность мембраноактивных белков и зоотоксинов у различных таксономических групп животных» (№ Гос. регистрации 01.97.0005378, 1998-2000 гг), «Эволюция морфо-функциональных изменений организма животных под влиянием факторов внешней среды» (№ Гос. регистрации 01.200009888, 2000-2003 гг).

Цель исследования: исследование морфо-биологических особенностей полозов и механизма действия компонентов ядов на синаптические, митохондриальные и бислойные липидные мембраны.

Задачи исследования: для реализации поставленной цели были определены следующие задачи:

- охарактеризовать морфо-биологические особенности змей родов *Coluber* и *Elaphe*;
- изучение численности разноцветного, пятнистого и узорчатого полозов, их сезонная и суточная активность;
- разработать технологию получения яда из секрета железы Дювернуа этих змей;
- провести сравнительную характеристику токсичности ядопродуктов железы Дювернуа разноцветного, пятнистого и узорчатого полозов;
- изучение механизма действия ядов и выделенных из них фракций на бислойные липидные и митохондриальные мембраны;
- выделить и охарактеризовать нейротоксические компоненты из ядов рассматриваемых змей.

Объект и предмет исследования. Объектами исследования явились змеи родов *Coluber* и *Elaphe*, а предметом исследования - морфо-биологические особенности полозов и изученние механизма действия их ядов на синаптические, митохондриальные и бислойные липидные мембраны.

Методы исследования. В работе применены зоологические, физиологические, биофизические и биохимические методы исследований.

Гипотеза исследования. Результаты комплексного изучения морфологии и биологии полозов окажет плодотворное влияние на решение теоретических вопросов современной зоологии и практических задач охраны видов полозов. Выявление механизма действия ядов позволит определить сходства и различия между ними и использовать эти параметры для идентификации видов в качестве дополнительных признаков. Компоненты ядов полозов способствуют созданию новых поколений фармакологических препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- распространение змей родов *Coluber* и *Elaphe* в биогеоценозе Узбекистана;
- морфо-биологические особенности полозов *Coluber ravergieri*, *Coluber tyria* и *Elaphe dione;*
- состав и свойства ядов полозов родов *Coluber* и *Elaphe;*
- ферментативная активность и механизм действия ядов на биологические мембраны.

Научная новизна работы. Изучены морфо-биологические особенности полозов, установлена их суточная и сезонная активности в различных условиях обитания, питания и размножения в биогеоценозах Узбекистана.

Установлена токсичность ядов змей родов *Coluber* и *Elaphe* на тепло и холоднокровных животных. Определены механизмы действия компонентов

ядов полозов на синаптические, митохондриальные и бислойные липидные мембраны.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Результаты исследования морфо-биологическим и функциональным особенностям полозов распространяют знания по теоретической и прикладной зоологии и физиологии животных. Эти данные служат для разработки мероприятий по охране рассматриваемых видов змей в биогеоценозах Узбекистана.

Действия ядов, рассматриваемых змей на функциональные параметры мембран, можно использовать в создание лечебных препаратов, изготовлении антисывороток нового поколения.

Реализация результатов. По материалам диссертации издана рекомендация: «Ядовитые животные Узбекистана и профилактика их укусов» (Нукус, «Университет», 2010. - 66 с.), которая используется в медицинских и других учреждениях республики.

Разработанные положения диссертации используются при проведении занятий в соответствующих факультетах Ходжейлинского педагогического и медицинского колледжей.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на конференциях: 15th World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins, (Glasgow, Scotland, 2006); «Зоология фанининг ҳозирги замон муаммолари» (Тошкент, 2011), V – Международной конференции, посвященной 20-летию создания научно технического общества Узбекистана «ТИНБО» (Ташкент, 2011).

Результаты исследований обсуждались на расширенном заседании лаборатории Общей паразитологии Института зоологии АН РУз и Института физиологии и биофизики АН РУз (5.05.2011), а также на Научном семинаре при Специализированном совете при Институте зоологии АН РУз (26.03.2012).

Опубликованность результатов. По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 9 журнальных статей и 3 тезиса в материалах международных и республиканских научных конференций и одна Методическая рекомендация.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 101 странице компьютерного текста и иллюстрирована 20 рисунками и 9 таблицами. Состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, приложений и списка литературы. Список литературы включает 125 источников, из них 66 иностранных авторов.

Структура автореферата соответствует структуре диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении диссертации обоснована актуальность проведенных исследований по морфо-биологическим особенностям полозов родов *Coluber* и *Elaphe*, механизм действия их ядов на синаптические, митохондриальные и бислойные липидные мембраны.

В первой главе представлены литературные данные по фауне, биологии, экологии ужеобразных змей, состав их ядов и механизм действия определенных компонентов на биологические мембраны.

Во второй главе приводится материал и методика исследований. Материал был собран в течение 1997-2011 годов на территории Ташкентской, Джизакской и Сурхандарьинской областей. За период полевых работ произвели отлов змей для исследования морфологии зубов и ядовитых желез, а также для оценки состава пищи. Обследовано 65 особей змей: 45 разноцветного и по 10 - узорчатого и пятнистого полозов. Сбор материала по морфологии и биологии рептилий проводился по общепринятой методике (Новиков, 1953), описанной в Определителе земноводных и пресмыкающихся (Терентьев, Чернов, 1949).

В лабораторных экспериментах использованы белые мыши и крысы, содержавшиеся в условиях вивария при температуре среды $+25^0$C и на стандартном рационе питания.

По разработанной методике путем массажа получали усиленную секрецию яда. С помощью специальной пипетки отбирали яд из ядовитых зубов змеи. Яд высушивали над хлористым кальцием в эксикаторе до получения белесоватых кристаллических пластинок.

При фракционировании яда змей использовали метод колоночной хроматографии, разработанной совместно с лабораторией энзимологии Института биохимии АН РУз. При подборе условий разделения яда проведено их фракционирование методом гель-фильтрации на сефадексах и TSK-геле HW-55, HW-65. Для изучения влияния ядов на процесс секреции медиаторов в нервно-мышечных синапсах использовались препараты портняжной мышцы с седалищным нервом лягушки *Rana temporaria*. Регистрацию миниатюрных потенциалов (МП) мышечных волокон, миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП) и потенциалов концевой пластинки (ПКП) осуществляли стандартной микроэлектродной техникой (Первис, 1963). Электрофизиологические эксперименты проводились совместно с сотрудниками Института физиологии и биофизики АН РУз.

БЛМ формировали методом, описанным Мюллером с соавт. (Mueller et al., 1963). Основная часть работы проводилась с мембранами сконструированными из общих фосфолипидов бычьего мозга, выделенных по методам Фолча и др. (Folch et al., 1957) и Хара и Радина (Hara, Rudin, 1978). Токи через одиночные каналы измерялись в режиме фиксации

мембранного потенциала электрометрическим Вольтметром В7-30 с входным сопротивлением 10^{12} ом.

Митохондрии печени крыс и змей выделяли методом дифференциального центрифугирования (Schneider, Hogeboom, 1951). Крысу обезглавливали, извлеченную печень помещали в стаканчик с ледяным раствором среды выделения следующего состава: сахароза 0.25 М., трис-HCL-буфер 0.01 М., pH 7.4, 1 мМ ЭДТА. После определения массы печени ее слегка подсушивали фильтровальной бумагой, затем пропускали через микропресс с диаметром отверстий 1 мм. Полученную кашицу гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком с 8 - 10 кратным объемом среды выделения. Ядра и клеточные фрагменты удаляли центрифугированием при 600 g в течении 10 минут в рефрижераторной центрифуге ЦЛР - I с ротором углового типа, при 0 ,-2 ^{0}C.

Митохондрии получали при центрифугировании пробирок с коагулянтом (5000 g в течение 15 минут). Затем из центрифужной пробирки удаляли надосадочную часть и в полученный осадок добавляли 0,1 мл среды выделения, из расчета на каждый грамм исходной сырой массы ткани. Суспензию тщательно перемешивали автопипеткой и переносили в стакан для хранения. Все процедуры по выделению и хранению митохондрий проводили при 0-2^{0}C. Детали использованных методических приемов изложены ранее (Франк и др., 1973). Параметры дыхания митохондрий изучали полярографическим методом по Чансу и Вильямсу (Chance et al., 1955). В другой серии экспериментов цельные яды змей использовали in vivo путем внутрибрюшинного введения ядов животным .

Белок определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951) посредством фотоэлектроколориметра при длине волны 570 нм.

Статистическую обработку полученных результатов и оформление иллюстрации производили по методу Стьюдента-Фишера, используя средние величины данных, средние квадратичные ошибки и достоверности различий, а также производили с помощью компьютерной программы Origin 6.1 и Excel.

Третья глава посвящена морфо-биологическим особенностям полозов родов *Coluber* и *Elaphe*, которые отлавливались на территории Термезского, Гагаринского, Ангорского и Шерабадского районов Сурхандарьинской области.

Морфо-биологические особенности пятнистого полоза *Coluber tyria.* Пятнистый полоз встречается в пределах Сурхандарьинской области, в основном, в песчаных и глинистых зонах, иногда его можно встретить и на поливных землях. Полагаем, что антропогенный фактор играет определённую роль в его вытеснении из мест привычного обитания. На территории Узбекистана данный вид достаточно приспособлен к присутствию человека и осваивает новые места, но уступает в этом отношении разноцветному полозу. Пять рептилий этого вида были пойманы

в непосредственной близости человеческого жилья в Термезском районе. По встречаемости наиболее распространен в Сурхандарьинской области, что связано с экологическими особенностями мест его обитания и, вероятно, с меньшей степенью урбанизации.

Мы наблюдали некоторую активность полоза. В первой половине марта, при температуре воздуха + 16^0C, а почвы - +19^0C, они становятся более активными в дневное время.

Средняя длина тела варьировала от 90 до 110 см. Убежищами для пятнистого полоза служат норы грызунов. В вечернее время, по нашим наблюдениям, местами убежищ они выбирают и груды камней, а на культурной территории они используют и искусственные конструкции. Молодых змеек мы не встречали. Особи данного вида полоза, при приближении, старались быстро спрятаться или срочно уползали. При их поимке змеи активно оборонялись и пытались укусить, однако если их отпустить, стараются быстро скрыться. По этологическому поведению можно сказать, что этот вид умеренно агрессивен. Время, наиболее удобное для наблюдений и отлова - утренние и вечерние часы, то есть,- прохладное время суток, хотя в культурной зоне встретили - 3 особи в полуденное время. В ходе экспериментов, некоторые особи были вскрыты для определения состава содержимого желудков. У пяти голов, пойманных в культурной зоне, основной рацион составили грызуны, у 2-х других (одна из которых была поймана в норе грызуна) в желудках найдены остатки ящериц и полупереваренная круглоголовка. Остальные отловленные змеи нами содержались в террариуме. Они достаточно быстро переходили на рацион, состоящийся из лабораторных мышей весом до 18 г.

Морфо-биологические особенности узорчатого полоза *Elaphe dione*. На территории Сурхандарьинской области встреченные особи данного вида рептилий имели размеры - 50-69 см. в длину, окраска тела, в основном, серо-бурого и тёмного цвета. Частота встречаемости - в среднем по 2 особи за каждые два часа похода, то есть данный вид мало распространен на территории этой области. Основная часть встречалась на территории Гагаринского и Шерабадского районов Сурхандарьинской области, в зонах кустарников и тугаев с наличием поблизости водоёмов или искусственных оросительных систем.

Первые особи зафиксированы в конце апреля, в данный период они были достаточно активными и часто грелись на солнце.

Начиная с мая, наблюдались в утренние и вечерние часы, а с середины лета - встречались в зонах с повышенной затененностью. Вблизи человеческого жилья не обнаружены. По поведению вид не агрессивен, старается вести скрытый образ жизни. При возникновении опасности прячется, а пойманная особь не пытается укусить и обвивается всем телом вокруг ловчей трости. В виду того, что данный вид по встречаемости довольно редок, брачующихся змей мы не наблюдали. Среди пойманных

змей оплодотворённых самок не обнаружили. Убежищами служат норы грызунов, пустоты под камнями и по густой травянистый покров по набережной водоёмов.

В конце мая некоторые самки уже были готовы к откладке яиц. Массовая откладка приходится на июнь и заканчивается в июле. Каждая самка откладывает 4-16 яиц, длиной около 5 см, а форма почти цилиндрическая с одинаковыми, закругленными концами. Только, что вылупившиеся детеныши имеют длину 10-15 см, а перезимовавшие 25-27 см (рис. 1).

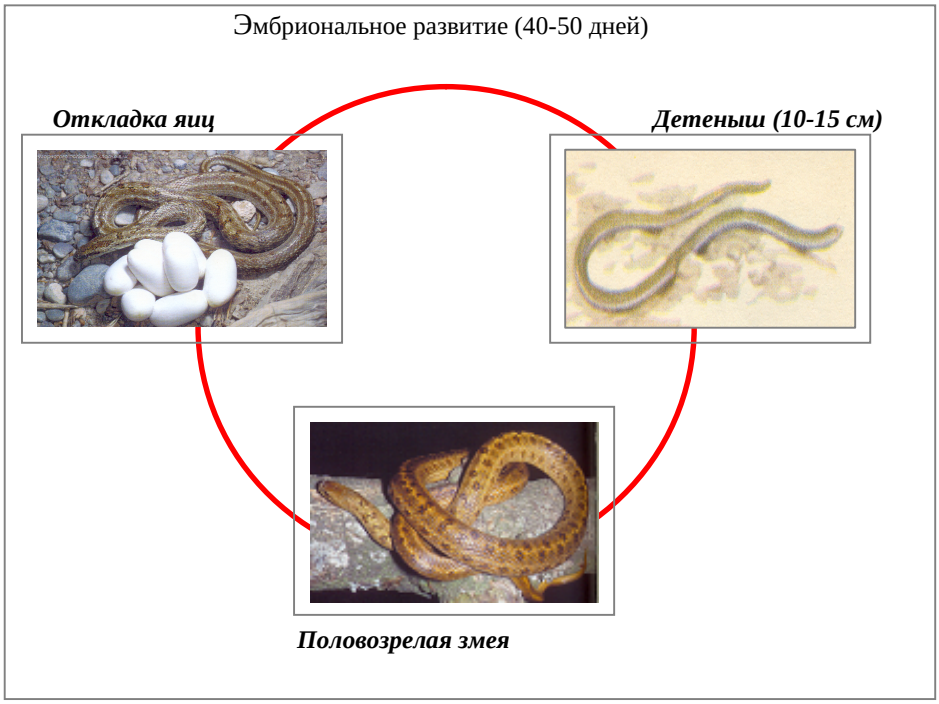


Рис.1. Схема размножения узорчатого полоза *Elaphe dione* (оригинал)

У отловленных змей, предназначенных для экспериментов, было обследовано содержимое желудков. Оно состояло, в основном, из мышевидных грызунов и ящериц. Одна из наблюдаемых особей была застигнута в процессе охоты на линейчатую ящурку. Узорчатый полоз, стремительно атаковав жертву, действовал как обычный песчаный удавчик, то есть задушил жертву кольцами своего тела в течении 10 минут. Заглатывание ящерицы змея начала с головы в течение 17 минут после предварительного обследования жертвы чувствительным язычком.

На зимовку уходит в конце октября - первой половине ноября. Зимует в норах грызунов. По результатам собственных исследований можно сделать вывод, что на фоне современного уровня развития антропогенного фактора, узорчатый полоз - *Elaphe dione* на территории Сурхандарьинской области редко встречается. Нуждается в предоставлении ему условий для размножения и сохранения своего ареала.

Морфо-биологические особенности разноцветного полоза - *Coluber ravergieri.* Разноцветный полоз – один из наиболее распространенных видов змей. Нами полоз наблюдался в населенных пунктах, предгорьях, горах и в пустынях Сурхандарьинской области.

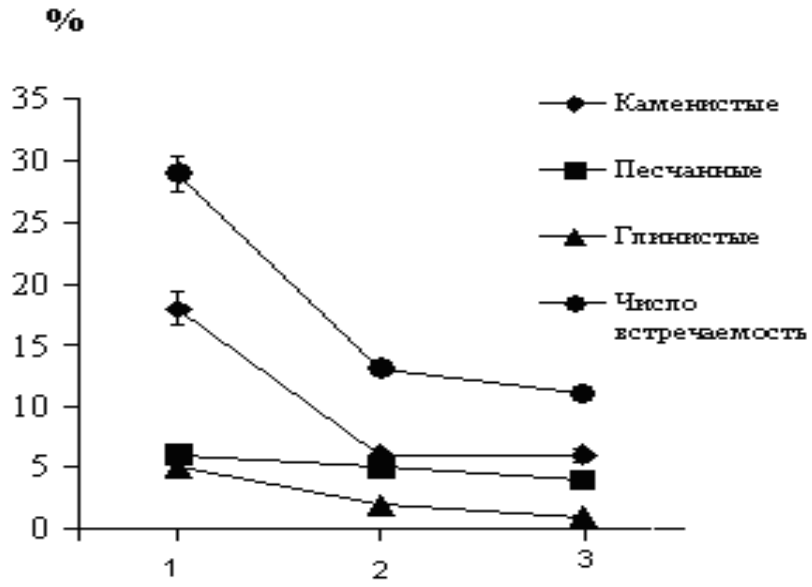
По нашим наблюдениям места обитания разноцветного полоза заметно меняются по сезонам. Так весной и осенью скопления змей наблюдаются в скалистых местах, среди нагромождений крупных камней, в щелях между которыми они зимуют. В жаркое время года (июнь, июль) полоз мигрирует в относительно влажные, поросшие травой и кустарником участки, нередко расположенные вблизи воды. Определенных условия полоз не избегает и зачастую использует местообитания антропогенного типа: плантации зерновых культур, люцерны и хлопчатника.

Змея средней величины: длина тела до 1200 мм, хвост короткий. Голова четко отграничена от значительно более тонкой шеи. Кончик морды тупо закруглен. Чешуя туловища с хорошо выраженными, нерезкими ребрышками, на каждом из которых по две апикальные поры. По бокам брюха заметно ребро, образованное брюшными щитками. Вокруг середины тела обычно 21 чешуя. 189-223 брюшных щитков, 70-99 пар подхвостовых щитков. Два верхнегубных щитка контактируют с глазом. Верхняя сторона тела имеет буровато-серую или серовато-коричневую окраску Для этого вида характерен проходящий вдоль спины продольный ряд бурых, буровато-коричневых или почти черных, поперечных или косых полосок, в некоторых местах сливающихся в сплошную зигзагообразную полосу. Более мелкие пятна того же цвета проходят одним или двумя рядами с каждой стороны тела. Вдоль хвоста три темные полосы выглядят как продолжение туловищных пятен. На верхней стороне головы небольшие, как правило, в светлой окантовке, пятна, иногда образующие правильный рисунок. От края глаза к углу рта тянется темная косая полоска, более короткая проходит под глазом. Нижняя сторона тела желтовато-розоватая, обычно с темными пятнышками.

В качестве убежищ использует пустоты и трещины в почве, под камнями, в скалах и лессовых обрывах, а также норы различных грызунов, сизоворонок, береговых ласточек и черепах.

После зимовки появляется, как правило, в конце марта — начале апреля, а в южных районах Узбекистана — в конце февраля. Активность продолжается до октября-ноября, в наиболее южных частях ареала она заканчивается в середине декабря.

Поселяется полоз обычно на песчаных, глинистых, солончаковых пустынях, лессовых обрывах и каменистых участках, а в тугаях и поливных землях (рис. 2).



1-*Coluber ravergieri*, 2- *Coluber tyria*, 3-*Elaphe dione*

Рис. 2. Биотопическое распределение полозов в Узбекистане

Откладывает яйца в июне-июле. В кладке 5-18 яиц размером 17-24 х 30-45 мм. Вылупление происходит в середине сентября, длина тела молодых 190-220 мм.

Большинство самок откладывают яйца в июле, самые ранние кладки отмечены в июне. Молодые особи появляются в конце августа или в начале сентября. Первый потомок найден 18 сентября 2007 г. в районе пос. Ангор. Его размер - 210 мм и вес - 5 гр.

Нами проведены лабораторные наблюдения. Отловленные змеи содержались в условиях, максимально приближенных к естественным. В рацион рептилий входили лягушки и новорожденные мышата и крысята. В неволе, одна из змей отложила 12 яиц с упругой кожистой оболочкой. Продольная длина яйца – 28,3±1,5 мм, диаметр – 17,7±0,7 мм и масса – 9,8±0,8 г. Яйца инкубировались в термостате при температуре 27^{o}C на древесных опилках, влажность 85-90%. Во время инкубации плесень не образовывалась. На 25 день яйца имели полувысохший вид.

Вылупление детенышей произошло на 32-й день. Отмечен 100%-ный выход эмбрионов. Через 3 дня проведен замер параметров тела: масса – 6,078±0,38 г, длина тела от головы до конца хвоста – 240,7±10,5 мм, а до анального отверстия – 189,2±5,5 мм. Окраска – бежевого цвета (табл. 1).

В условиях неволи полоз может голодать до 1-1,5 месяца, сильно теряя при этом в весе. При вскрытии у таких змей не обнаруживалось жирового запаса, а внутренние органы и мышцы - деформированы.

Таблица 1

Развитие разноцветного полоза *Coluber ravergieri* в лабораторных условиях

Рост и развитие	Длина тела, мм	Длина тела до анального отверстия, мм	Масса, г
Эмбрион	86±1,2	56±0,8	2,1±0,1
Детеныши	240±1,4	180±0,2	6,9±0,4
Змея взрослая	1100±1,8	840±1,0	145±1,4

Разноцветный полоз, по сравнению с другими полозами, обитающими на территории Сурхандарьинской области, является широко распространенным видом. Первая линька полозов происходит после пробуждения от зимней спячки (начало апреля) и продолжается до конца месяца, вторая - в июне-июле. Период третьей линьки сильно растянут: у самцов она начинается после жарких дней августа, а у самок – с середины сентября. Перед линькой змеи сильно раздражены и беспокойны. Признаком начинающейся линьки является помутнение роговицы глаза, а спустя 5-7 дней, - змея выползает из старой кожи.

Наблюдения показали, что в неволи полозы линяют 3 или 4 раза в году и легче, чем в природных условиях. Почувствовав опасность полоз стремится уползти, но при непосредственной угрозе активно защищается и далее кусается, при этом может прокусить кожу и вызвать отравление. После укуса моментально ощущается резкая боль. Через 10-20 минут появляется отек, распространяющийся на всю конечность. Кожа приобретает багрово-синюшный оттенок. Ощущается головокружение, беспокоят боли по ходу лимфатических сосудов. Болевые ощущения переходят и на другую конечность. В результате обширного отека и болей происходит ограничение подвижности. Через 2-3 суток боль стихает, отеки уменьшаются.

В четвертой главе приведен материал по ядопродуктивности полозов рода *Coluber, Elaphe* и посвящена общей характеристике ядовитого аппарата и яда полозов. Эволюционные преобразования в ядовитом аппарате змеи из различных семейств отражают основные особенности их питания. Естественная ядовитость слюны отдельных представителей змей объяснима с точки зрения наличия в ней различных пищеварительных ферментов. Это свойство закреплялось в процессе эволюции, так как повышало эффективность охоты и процесс пищеварения за счет наличия ферментов секрета слюны. Постепенно слюнные железы - верхнегубные, височные - стали специализироваться на выработке, преимущественно, ядовитого

секрета. Одновременно происходило и формирование аппарата для активного введения яда в тело жертвы. Отдельные зубы, находящиеся на заднем или переднем конце верхней челюсти, увеличивались в размерах, на их передней поверхности появлялась бороздка, по которой стекал яд. Затем при замыкании бороздки образовался внутренний канал, открывающийся выпускным отверстием недалеко от вершины зуба, что существенно повысило эффективность введения яда в тело жертвы (Jidex, 1971).

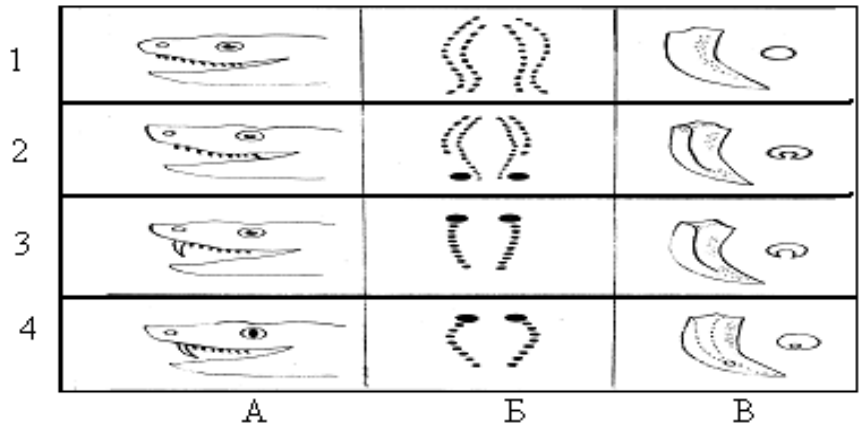
У полозов ядовитые зубы сидят на заднем крае верхнечелюстной кости и отделены от других беззубым промежутком, поэтому их принято называть заднебороздчатыми (рис.3). Эти змеи имеют ядовитую железу (железа Дювернуа), протоки которой заканчиваются у основания ядовитых зубов. Поскольку зубы расположены в глубине пасти, на заднем крае верхнечелюстной кости, змея может нанести укус жертве в том случае, если она находится во рту. В связи с этими особенностями представляет определенные трудности процедура получения яда у заднебороздчатых змей. Ядовитые железы расположены позади глаз, имеют альвеолярное строение, а у некоторых представителей достигают крупных размеров.

У всех обследованных змей длина бороздчатых зубов зависит от размера животного – у пятнистого полоза она колеблется в пределах 3-4 мм, у узорчатого полоза 2-4 мм. В ротовой полости змей находится два бороздчатых зуба, имеющих коническую форму в виде толстой иглы и сидят прямо на поверхности челюсти. По переднему краю зуба проходит глубокая борозда, служащая стоком для яда. Борозда более широкая и глубокая ближе к основанию зуба и более мелкая и узкая- возле зубного острия. Ядовитые железы змей (железа Дювернуа) расположены под глазом и отчасти позади него.

С помощью специальных пипеток мы отбирали яд из ядовитых зубов разноцветного, пятнистого и узорчатого полозов. Выход яда составил 0,3-0,4 мл на змею или 12±5 мг сухого остатка яда. Ядопродукция зависит от пола, возраста, размера, упитанности, массы железы Дювернуа и физиологического состояния змей.

Наибольшее выделение секрета из железы Дювернуа приходится на лето, т.е. на период усиленного питания змей. С сентября-октября происходит снижение выхода яда, достигающее к январю-марту минимальной точки.

Змеиные яды – представляют собой сложную смесь ферментов, (преимущественно гидролаз) токсических полипептидов, совокупности белков со специфическими действием и неорганических веществ. Ферменты змеиных ядов, которым отводится немаловажная роль в механизме токсического действия, могут также служить сырьем для получения в чистом виде ферментов, необходимых для исследовательских и медицинских целей.



1 гладкозубые неядовитые змеи; 2 – заднебороздчатые ядовитые змеи с зубами, раположенными на верхней челюсти в глубине пасти; 3 - переднебороздчатые ядовитые змеи; 4 – ядовитые змеи с трубчатыми зубами(яд стекает по каналу через отверстие около острого конца зуба), расположенными на верхней челюсти впереди.

А – расположение зубов; Б - следы укуса на коже; В – строение зуба.

Рис. 3. Схема строения ядовитого аппарата змей (справа поперечный срез зуба)

Результаты биохимических исследований показали, что в яде пятнистого полоза присутствует протеаза - 0,15 мкмоль/мин.*мг., фактор роста нерва (ФРН) – 560 БЕ/мг белка, содержание белка составляет – 70-80%. В яде узорчатого полоза мы обнаружили протеазу - 0,17 мкмоль/мин.*мг белка и фактор роста нервов (ФРН) - 585 БЕ/мг белка, содержание белка составляет 70-80, а в яде разноцветного полоза - протеазу - 0,18 ±0,02 мкмоль/мин.мг белка и фактор роста нервов (ФРН) - 800 ± 49,2 БЕ/мг белка. В яде исследованных змей выявлена значительная фосфолипазная активность с достаточно близким значением удельной активности для всех исследованных змей - от 0,22 мкмоль/мин.*мг белка для яда пятнистого полоза, до 0,30 мкмоль/мин.*мг белка - для узорчатого полоза, 0,27±0,035 мкмоль/мин.мг белка для яда разноцветного полоза.

Установлено, что токсичность яда кобры и гюрзы существенно выше, чем у исследованных видов змей и близка к значениям токсичности яда эфы. Так, различие с ядом кобры является 17-20-кратным, с ядом гюрзы - 3-5-кратным, а с ядом эфы - менее 2 раз. Эти данные являются определенным основанием для того, чтобы отнести изученных нами змей к группе ядовитых рептилий.

Яд разноцветного полоза у подопытных животных вызывает тахикардию, переходящую в брадикардию, отмечается гипоксия, реакция на различные раздражители замедлена. Животные погибают с явлениями паралича, конвульсий и расстройством дыхательных движений.

При отравлении ядом пятнистого и узорчатого полозов основная черта интоксикации -это проявление нейротоксического эффекта, выражающийся в чрезмерном возбуждении животных после введения им яда и отсутствием

местной реакции. Животные погибают с явлениями паралича, конвульсий и расстройством дыхательных движений. Определение токсичности ядов змей показало, что она обусловлена наличием нейротоксинов и гидролазных ферментов.

В настоящей работе сопоставлены эффекты, оказываемые в условиях *in vivo* на митохондрий цельными ядами различных змей родов *Coluber* и *Elaphe*. Эксперименты выполнены на мышах посредством внутрибрюшинного введения летальных доз ядов змей: разноцветного, узорчатого и пятнистого полозов (табл. 2).

Таблица 2

Влияние цельных ядов полозов на параметры функционального состояния митохондрий печени крыс (n=9-12)

Вариант	**V_0**	**V_3**	**V_4**	**ДК**	**АДФ/0**
Субстрат окисления 5 мМ сукцинат					
Контроль	28,4 ±2,2	84,3±6,0	26,6±4,2	3,47	1,8±0,16
Яд разноцветного полоза	55,6±4.3	68,2±3,3	42,4±2,7	1,70	1,79±0,18
Яд пятнистого полоза	44,4±3,8	88,4±9.1	39,4±4,6	2,7	1,75±0,34
Яд узорчатого полоза	42.3±7,8	87,3±9.0	38,4±2,4	2,22	1,73±0,28

Примечание: Во всех случаях P < 0,05 (n = 8 - 12). Доза ядов используемых в митохондрий составляет для разноцветного - 7,96 мг/кг, пятнистого – 9,65 мг/кг и узорчатого- 9,84 мг/кг полозов.

Полученные результаты в экспериментах in vivo при изучении действия яда разноцветного полоза на организм в летальных дозах 7,95 мг/кг и показали, что в этих условиях отмечается существенное изменение функции митохондрий. Менее эффективно действовали яды пятнистого и узорчатого полозов, хотя и в этом случае происходило заметное снижение фосфорилирующей активности митохондрий печени. При введении яда пятнистого и узорчатого полозов в дозах 9,65 мг/кг и 9,84 мг/кг отмечено заметное возрастание интенсивности дыхания в метаболическом состоянии v_4 и практически отсутствовал эффект в $\mathbf{V_3}$.

При исследовании действия цельного яда разноцветного полоза на проводимость БЛМ показало, что добавка 1,0 мкг/мл яда в один из отсеков экспериментальной ячейки повышает проводимость мембран на несколько порядков. В присутствии цельного яда пятнистого полоза в одном из отсеков экспериментальной ячейки в концентрации 0,20 мкг/мл было обнаружено, что течение тока через бислойные липидные мембраны

повышается на несколько порядков (рис.4). Цельный яд узорчатого полоза в концентрации 0,30 мкг/мл в один из отсеков экспериментальной ячейки приводит к повышению проводимости БЛМ на несколько порядков.

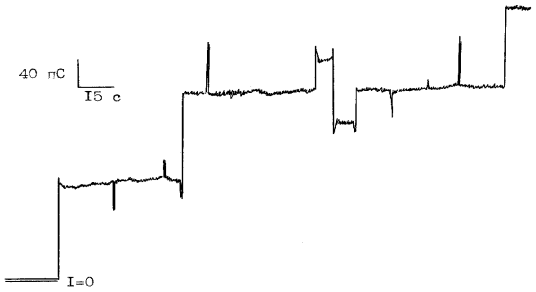


Рис.4. Запись тока через каналы, образуемые в БЛМ ядом пятнистого полоза. (Концентрация яда - 0.10-0.25 мкг/мл. Среда: 0.1 М KCl, 5 мМ трис-HCl, pH = 7.5).

Мы также производили аппликацию яда разноцветного, пятнистого и узорчатого полозов на изолированных митохондриях печени крыс. При концентрации 200 мкг/мл яда полозов вызывает подавление скорости дыхания митохондрий в состоянии 3 и повышает его в состоянии 4. Этот эффект менее выражен при низких дозах препарата яда (40-80 мкг/мл).

В экспериментах на нервно-мышечных синапсах озерной лягушки выявлено, что в яде двух форм разноцветного полоза имеется компонент, который подобно нейротоксинам яда кобры взаимодействует с холинорецепторами постсинаптических мембран, блокирует их функционирование и в результате нарушает синаптическую передачу.

В результате проведенных исследований, выявлены некоторые особенности разных фракций яда разноцветного полоза по их специфике действия на функциональные параметры Мх печени крыс.

Первая фракция яда в дозе 10 мкг/мл вызывает ингибирование дыхания Мх в состоянии 3 и в небольшой степени - повышает дыхание в состоянии 4. При аппликации II фракции яда разноцветного полоза на Мх, получены эффекты, характерные для нейротоксина, т.е. разобщение дыхания Мх, повышение скорости дыхания в состоянии 4. При использовании в экспериментах III, IV, V фракций на митохондриях отмечены, с одной стороны, частичное разобщение.

В экспериментах на нервно-мышечных синапсах лягушки впервые установлено, что отдельные фракции яда *Coluber ravergieri* в концентрациях $1\text{-}5\times10^{-6}$ г/мл вызывают снижение амплитуды миниатюрных потенциалов (МПКП) и ПКП.

Coluber ravergieri содержат в составе яда нейротоксины, блокирующие синаптическую передачу, которые увеличивают интегральную проводимость БЛМ, разобщают окислительное фосфорилирование и оказывают видо-специфичный эффект на дыхание митохондрий. Аналогично с

постсинаптическим действием обладает кобротоксин, выделенный из яда *Naja naja oxiana*, который избирательно блокирует рецепторы постсинаптической мембраны.

Исходные критерии состоят в том, что каналообразующее свойство и другие параметры ядов у представителей одного и того таксона являются схожими, поэтому разграничение родов и видов можно провести на основании изучения химического состава и свойства ядов. Следовательно, биофизические и физиологические исследования механизмов действия ядов различных змей на мембранном уровне могут оказаться существенными для выяснения систематического положения изучаемых представителей змей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наши исследования выполнены на основе изучения морфологии и биологии трех видов змей, принадлежащих родам *Coluber* и *Elaphe*, а также структуры их ядовитого аппарата и токсикологического анализа их ядов.

Яды змей полозов обладают протеолитической, геморрагической, коагулирующей, фибринолитической и нейротоксической активностями. Причем, в характере интоксикации превалирует нейротоксический эффект.

Представители родов *Coluber* и *Elaphe* широко распространены и представляют важные компоненты биологического разнообразия фауны Узбекистана. По современным оценкам рассматриваемые роды ужеобразных змей объединяют значительное число видов (Богданов, 1992; Дунаев, Орлова, 2003; Орлов, Гелашвили, 1985; Шерназаров и др., 2006).

В отношении видовой самостоятельности ряда видов *Coluber* и *Elaphe*, да и в целом, представителей семейства ужеобразных, единого мнения не сложилось.

Морфологические признаки ряда форм, как например, *Coluber raergieri*, обычная и черноголовая формы принимаются в качестве самостоятельных видов или подвидов.

Эти и другие вопросы, связанные с таксономией указанного вида позволили нам обрисовать общую морфологию различных форм полозов и провести эксперементальные исследования структурно-функциональных особенностей яда *Coluber ravergieri*.

Представляет большой интерес результаты работы по использованию механизма действия ядов для решения вопросов таксономии. В этом плане, нами рассмотрены механизм действия ядов обычной и черноголовой формы разноцветных полозов *Coluber ravergieri* на БЛМ, митохондриях и синапсах. Показано, что их яды по токсикологическим и биофизическим параметрам не отличаются. Мы полагаем, что обе формы этих змей, очевидно представляют один вид.

Выводы:

1. Получены новые данные по морфо-биологическим особенностям змей родов *Coluber* и *Elaphe*. В частности, выяснены морфо-функциональные особенности желез Дювернуа видов змей *Coluber ravergieri, Coluber tyria* и *Elaphe dione*. На основе изучения строения ядовитых зубов и желез Дювернуа, разработан новый способ получения яда у этих змей.
2. Разноцветный полоз (*Coluber ravergieri)* – наиболее распространенный вид, а ареалы пятнистого (*Coluber tyria)* и узорчатого (*Elaphe dione*) полозов - охватывают небольшую территорию, главным образом горные и высокогорные районы.
3. Сезонная и суточная активность полозов меняется в течение года в зависимости от климатических факторов и мест обитания. Полозы активны в течение 7-8 месяцев. Они раньше покидают зимние убежища (март) и позднее залегают в зимнюю спячку (ноябрь). Весной и осенью в суточной активности у полозов наблюдается один пик – днем, летом - 2 пика- утром и ночью.
4. Выявлена стабильность расселения видов *C. ravergieri, C. tyria* и *Elaphe dione* в биотопах различного характера. Пищу полозов, в основном составляет амфибии, рептилии, мышевидные грызуны, птицы и насекомые. При отсутствии пищи полозы мигрируют в населенные пункты.
5. Впервые исследовались яды видов змей: *Coluber ravergieri, Coluber tyria, Elaphe dione*. Установлена токсичность на теплокровных животных (белые мыши, крысы) и показано, что LD_{50} яда разноцветного, пятнистого и узорчатого полозов составляет 7,96±0,61; 9,65±0,67; 9,84±1,0 мг/кг.
6. Из яда обеих форм разноцветного полоза *Coluber ravergieri* выделена нейротоксическая фракция. Сходства состава яда и токсического эффекта позволили нам считать, что эти две формы змей принадлежат к одному виду - *Coluber ravergieri*. Отмеченные формы, являются морфами разноцветного полоза.
7. Проведенный анализ эффекта цельного и различных фракций яда разноцветного полоза на изолированные митохондрии и на БЛМ показал, что основным каналоформирующим компонентом яда является фракция II, обладающая нейротоксической активностью, что может лежать в основе токсической активности ядов змей полозов.
8. Результаты комплексного изучения полозов можно использовать для охраны этих змей в биогеоценозах Узбекистана и профилактики укусов, а также создании лекарственных форм нового поколения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Алматов К.Т.. Азимов Д.А. Anthony T.Tu. Влияние разных фракций яда водяного ужа *Natrix tessellata (Brandt)* на бислойные липидные и митохондриальные мембраны // Известия ВУЗов. – Ташкент, 2003. - №2. - С.8-12.
2. Казаков И., Каликулов Д., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Азимов Д.А. Исследование действия яда разноцветного полоза *Coluber ravergieri* на синаптическую передачу у лягушки // Известия ВУЗов. – Ташкент, 2003. - №1-2. - С.13-15.
3. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Алматов К.Т., Азимов Д.А. Действие яда пятнистого *(Coluber tyria Linnaeus*) и узорчатого полозов *(Elaphe dione Pallas*) на бислойные липидные и митохондриальные мембраны // Известия ВУЗов. – Ташкент, 2003. - №1-2.- С. 37-42.
4. Казаков И., Реймбаева Р.С., Абубакирова М.И., Рахимова Ш.Х., Азимов Д.А. Газокислородный обмен и метаболические показатели сыворотки крови у змей (сем. Colubridae) при разных температурных условиях // Известия ВУЗов. – Ташкент, 2003. - №1-2.- С. 55-70.
5. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Алматов К.Т., Азимов Д.А. Токсикологическая характеристика действия ядов змей сем. Colubrida*e //* Известия ВУЗов. – Ташкент, 2003. - №1-2.- С.32-34.
6. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Азимов Д.А. Действие яда узорчатого полоза (*Elaphe dione Pallas*) сем. Colubridae на бислойные липидные и митохондриальные мембраны //Доклады АН РУз.- Ташкент, 2004. - №1.- С.99-103.
7. Реймбаева Р.С. Ферментативная активность и особенности токсического действия ядов змей семейства Colubridae. //Вестник Каракалпакского отделения Академии наук Республики Узбекистан.- Нукус, 2004. -№5/6.- С.41-43.
8. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Азимов Д.А. Действие яда пятнистого полоза *Coluber tyria* сем. Colubridae на биологические мембраны // Узбекский биологический журнал. – Ташкент, 2004. - №2. - С.56-61.
9. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Азимов Д.А. Действие яда некоторых змей семейства Colubridae на биологические мембраны // Вестник Каракалпакского отделения АН РУз. – Нукус, 2005. - №1-2. - С.16-18.
10. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С., Азимов Д.А., Мирходжаев У.З. «Ядовитые животные Узбекистана и профилактика их укусов». –Нукус: «Университет» -2010.- 66 стр.
11. Akhmedov K., Kazakov I., Abubakirova M. I., Reimbaeva R.S. Effect of snake venom (Duvernoys gland secretions Coluber revergieri on frog nerve-

muscle preparation // 15th Annual Congress on Animal Pland and Microbiol Toxins, Sunday 23rd July to Friday 28th July 2006.- Glasgow, Scotland, -2006. -P.186.

12. Казаков И., Абубакирова М.И., Реймбаева Р.С. Таксономическое значение ядов змей сем. Colubridae // Актуальные проблемы изучения и сохранения животного мира Узбекистана. Материалы научной конференции, посвященной 60-летию Интитута зоология АН РУз. Ташкент. 2011.- С.29.
13. Kazakov. I., Abubakirova M.I., Reymbayeva R.S., Rahmatullaev E.A. Toxicology of Colubridae (rear-fanged snakes) venom from Uzbekistan // V –International conference devoted to twenty years creation of scientific and technical society of Uzbekistan “TINBO” “The strategy of development of science and technology in XXI century”.-Tashkent., Uzbekistan, 6-7 July 2011. -P.140-141.

Выражаю глубокую благодарность научному руководителю, д.б.н Казакову И. К., академику АН РУз. Азимову Д.А., коллегам по работе д.б.н. проф. Ахмерову Р.Н., к.б.н. Голованову В.И. и к.б.н. Абубакировой М.И. за всестороннюю помощь в обсуждении и анализе полученных экспериментальных данных и ценные советы в процессе выполнения работы.

Р Е З Ю М Е

диссертации Реймбаевой Розы Сапарбаевны на тему: «Морфо-биологические особенности полозов: *Coluber* и *Elaphe*, мембраноактивность их ядов» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.00.08 - Зоология, 03.00.13 - Физиология человека и животных

Ключевые слова: полозы, морфология, биология, яды, нейротоксины, ионные каналы, митохондрия.

Объект исследования: змеи родов *Coluber* и *Elaphe.*

Цель работы: является исследование морфо-биологических особенностей полозов и механизма действия компонентов ядов на синаптические, митохондриальные и бислойные липидные мембраны.

Методы исследований: зоологические, экологические, физиологические, биофизические и биохимические методы исследований.

Полученные результаты и их новизна: изучены морфо-биологические особенности полозов, установлены суточная и сезонная активности в различных условиях обитания, питания и размножения в биогеоценозах Узбекистана.

В процессе изучения действия цельных ядов змей родов *Coluber* и *Elaphe* на биологические мембраны выявлены нейротоксические компоненты.

Практическая значимость: Полученные данные важны для разработки мероприятий по сохранению биоразнообразия рассматриваемых видов змей в биогеоценозах Узбекистана.

Действия ядов, рассматриваемых змей на функциональные параметры мембран, можно использовать при создании лечебных препаратов и изготовления антисывороток нового поколения.

Степень внедрения и экономическая эффективность: полученные результаты, на основе изученных ядов и их компонентов, служат предпосылкой для поиска новых фармакологических препаратов в области здравоохранения при лечении различных заболеваний сердечно-сосудистой системы, в том числе и профилактики свертывания крови.

Область применения: охрана природы, здравоохранение, зоология, физиология, биофизика и в учебном процессе.

Биология фанлари номзоди илмий даражасига талабгор Реймбаева Роза Сапарбаевнанинг 03.00.08 – Зоология ва 03.00.13 - Одам ва ҳайвонлар физиологияси ихтисосликлари бўйича «*Coluber* ва *Elaphe* авлодига мансуб илонларнинг морфо-биологик хусусиятлари заҳарининг мембранафаоллиги» мавзусидаги диссертациясининг

Р Е З Ю М Е С И

Таянч (энг муҳим) сўзлар: илонлар, морфология, биология**,** заҳарлар, нейротоксинлар, ион каналлари, митохондрия.

Тадқиқот объектлари: *Coluber* ва *Elaphe* авлодига мансуб илонлар: чипор илон - *Coluber ravergieri* (оддий формаси), холдор илон – *Coluber tyria* ва нақшдор илон - *Elaphe dione.*

Ишнинг мақсади: Ўзбекистон ҳудудида учрайдиган *Coluber* ва *Elaphe* авлодига мансуб илонлар морфо-биологиясини ўрганиш ва илонлар заҳарини мембранафаоллигини ўрганиш бўйича қиёсий тадқиқотларни ўтказиш.

Тадқиқот усуллари: зоологик, экологик, физиологик, биофизик ва биокимёвий усуллар.

Олинган натижалар ва уларнинг янгилиги: Ўзбекистон ҳудудида учрайдиган *Coluber* ва *Elaphe* авлодига мансуб илонларнинг морфо-биологик хусусиятлари, мавсумий ва кунлик фаоллиги, озиқланиш ва кўпайишига кўра тавсифлаб берилди.

Coluber ва *Elaphe* авлодига мансуб илонларнинг заҳарини биологик мембраналарга таъсирини ўрганиш жараёнида заҳар таркибида нейротоксик компонентлар борлиги аниқланди.

Амалий аҳамияти: Олинган натижалар Ўзбекистон биогеоценозидаги ўрганилаётган илонлар турларини биохилмахиллигини сақлаш чора-тадбирларини ишлаб чиқишда муҳим ўрин тутади.

Ўрганилаётган илонлар заҳарини мембрана функционал параметрларига таъсири борасида олинган натижалар зардобга қарши янги даво препаратларини ишлаб чиқишда қўлланилиши мумкин.

Татбиқ этиш даражаси ва иқтисодий самарадорлиги: заҳарлар ва уларнинг компонентларини ўрганиш бўйича олинган натижалар соғлиқни сақлаш тизимида юрак қон-томир касалликлари ва қон ивишини олдини олишда янги фармацевтик препаратларни излашда ўз самарасини беради.

Қўлланиш (фойдаланиш) соҳаси: табиатни муҳофаза қилиш, соғлиқни сақлаш, зоология, физиология, биофизика ва ўқув жараёнларида.

RESUME

Thesis of Reymbaeva Roza Saparbaevna on the scientific degree competition of the doctor of Philosophy in biology on specialities 03.00.08 - zoology and 03.00.13 - physiology of the person and animals, subject: “A characteristic of the morpho-biological and membrane activity of the venom of *Coluber* and *Elaphe* ”

Key words: snake, morphology, biology, venoms, neurotoxins, ion channels, mitochondria.

Subjects of research: snakes: *Coluber ravergieri*, *Coluber tyria* and *Elaphe dione*.

Purpose of work: the purpose of this work is the study of the ecological-biological characteristic of the *Coluber* and *Elaphe* snakes, comparative studies of the membrane activity of the secrets a venomous snakes of Uzbekistan, the characteristic of their biological traits.

Methods of research: zoological, ecological, physiological, biophysical and biochemical methods of work are applied in this work.

The results obtained and their novelty: several snake species of the *Coluber* and *Elaphe* , in relation to their daily and seasonal activity, conditions of habitation and breeding in biogeocenoses of Uzbekistan have been characterized.

During the study of the effect of crude venoms of *Coluber* and *Elaphe* snakes on biological membranes, neurotoxic components, which are the basis for further studies on the isolation of individually pure neurotoxins, were revealed.

Practical value: the resultes which were taken are very important to produce the way of keeping biodifference types of snekes being learnt in Uzbekistan.

It is possible to use zootoxin effect of the animals under study on the functional parameters of membranes create prerequisites for the use of these venoms and target tools in studies in the sphere of membranology and zootoxicology.

Degree of embed and economic effectivity: results obtained during the study of venoms and components are a prerequisite for the search of new pharmacological preparations in the system of public health for the treatment of various cardio-vascular diseases, including the prophylaxis of blood coagulation.

Field of application: nature conservation, public health, physiology, biophysics.