RESEARCH JOURNAL OF TRAUMA AND DISABILITY STUDIES

Volume: 3 Issue:2 | February–2024 ISSN: 2720-6866
http://journals.academiczone.net/index.php/rjtds

Определение Токсичности (Летальной Дозы Ld50) Сухого Нативного Яда Змеи Среднеазиатской Гюрзы (Macrovipera Viperae Lebetinae Turanica)

Саттаров Музаффар Эштемирович
К.б.н., доцент, заведующий коллекции микроорганизмов Ташкентского научно-исследовательского института вакцин и сывороток, г. Ташкент

Абдуллаев Хаётбек Абдугаффор угли
Магистрант Ташкентского фармацевтического, института г. Ташкент

Усманова Закира
К.б.н., доцент Ташкентского фармацевтического института г. Ташкент

Мирзалиева Гулноза Алишер қизи
С.н.с. Ташкентского научно-исследовательского,института вакцин и сывороток, г. Ташкент

Аннотация. В этой статье изучена доза LD50 яда змеи гюрзы. По полученным результатам установлено, что исследуемый яд представляет собой остро токсичное соединение. Этот змеиный яд можно использовать в фармацевтике и химии в виде сыворотки.

Ключевые слова: гюрза, кровь, токсичность, змеиный яд, LD50, Macrovipera viperae lebetinae turanica.

ВВЕДЕНИЕ. Более 220 000 видов, или примерно 15%, животных на земле ядовито [1].

Огромное разнообразие активных молекул, обнаруженных в биологических токсинах, превосходит синтетические соединения, созданные человеком. Действуя на протяжении сотен миллионов лет, естественный отбор разработал и усовершенствовал невероятный ассортимент биомолекул, предлагая бесконечный набор инструментов для программ открытия лекарств. За бесчисленные годы естественной эволюции были разработаны биологические яды, которые приобрели беспрецедентную эффективность и избирательность для быстрого вмешательства в определенные функциональные процессы. Поэтому неудивительно, что на протяжении всей истории биологические токсины имели множество применений: от лечения артрита и желудочно-кишечных заболеваний до современного оружия массового уничтожения [2, 3, 4, 5, 6]. Новые подходы в фундаментальных и трансляционных исследованиях открыли совершенно новые возможности для применения природных токсинов для выяснения фундаментальных физиологических и нейробиологических процессов, а также для растущих усилий по расшифровке их терапевтического потенциала [7, 8, 9, 10, 11]. Тем не менее, в настоящее время фармакологически охарактеризована лишь небольшая часть токсинов и ядов.

Токсичность – величина обратная среднесмертельной дозе (концентрации), т. е. чем выше среднесмертельная доза (концентрация), тем ниже токсичность вещества. Показателями токсичности являются среднесмертельная доза.

Среднесмертельная доза (DL_{50}) – доза вещества, вызывающая гибель 50% животных при однократном введении, выражается в миллиграммах вещества на 1 килограмм массы животного (мг/кг).

Volume: 3 Issue:2 | February–2024 ISSN: 2720-6866
http://journals.academiczone.net/index.php/rjtds

Летальной дозой $ЛД_{50}$ или $ЛД_{100}$ называют среднюю дозу вещества в миллиграммах на 1 килограмм живой массы, вызывающей гибель, соответственно, 50% или 100% подопытных животных. Этот показатель используется при характеристике острой токсичности ядовитых веществ, а также при оценке степени токсичности химических или лекарственных препаратов и ядов животного происхождения.

Определение среднесмертельной дозы $ЛД_{50}$ ядовитых веществ (в том числе и ядовитого секрета змей) предполагает построение зависимости эффекта воздействия яда (летальности экспериментальных животных) от количества вводимого ядовитого секрета $ЛД_{50}$, выраженная в мкг/г (или мг/кг), отражает ту дозу яда, при которой наблюдается гибель 50% экспериментальных животных. Определение $ЛД_{50}$ яда гюрзы в «классическом» варианте предполагает инъекцию раствора ядовитого секрета экспериментальным животным одинаковой массы, сформированным в группы, и на каждой группе животных анализируют одну дозу яда. В токсикологическом эксперименте по определению $ЛД_{50}$ необходимо использовать животных одинаковой массы, одного пола, содержащихся в одинаковых условиях (режим кормления, температура и т.п.). В частности, в экспериментах на мышах рекомендовано использовать мышей-самцов массой 20,0 ± 1,0 г. При таком подходе сводятся к минимуму и половые различия, и различия, обусловленные онтогенетическими особенностями.

МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ. Лабораторные аналитические весы для высокоточного взвешивания с действительной ценой деления шкалы (d) 0,0001, шприцы вместимостью 1 мл, пипетки с градуировкой от конца, вместимостью 1, 2, 5 и 10 мл первого класса точности [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ. Определение токсичности. Сухой цельный яд был взвешен на аналитических весах с d=0,0001, растворен и разведен 1:4000 ($2{,}5x10^3$ г/мл) в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида.

Для лучшего растворения раствор инкубируют на водяной бане при температуре 37°C в течение 15 мин при периодическом встряхивании. Затем раствор помещают в холодильник и выдерживают в течение 24 часов при температуре +4°C. После этого раствор яда центрифугируют 5 мин. при 3000 об/мин.

Осторожно сливают и используют при определении токсичности. Рабочие разведения препаратов ядов готовили непосредственно перед проведением исследований.

Каждой мыши вводят подкожно равное количество испытуемого раствора. В каждой группе по 5 мышей.

В качестве контрольной пробы был использован раствор стерильного изотонического натрия хлорида. В контрольной группе все мыши остались живы.

В ходе исследования токсичности было однократное подкожное введение изучаемого яда клинически здоровым белым мышам массой 20 ± 1 грамм.

Каждый раствор ввели шприцем, объемом 1 мл, подкожно согласно нижеприведенной таблице. За животными наблюдали в течение 24 часов для определения $ЛД_{50}$.

Животные находились под ежечасным наблюдением в течение всего хода эксперимента. У мышей в течение опыта наблюдали за выживаемостью, общим состоянием, возможными судорогами и активностью, учитывая поведенческие реакции.

Все подопытные животные содержались в одинаковых условиях и на общем рационе питания со свободным доступом к воде и пище.

Учет результатов погибших и выживших мышей проводилось в течение 24 часов после инъекции в каждой испытуемой группе. Для вычисления среднесмертельной дозы $ЛД_{50}$

Volume: 3 Issue:2 | February–2024 ISSN: 2720-6866
http://journals.academiczone.net/index.php/rjtds

используют метод пробит анализа [16], модифицированный для включения значений 0 и 100% гибели животных.

Таблица 1. Результаты погибших и выживших мышей в течение 24 часов после инъекции

№	Количество вводимого раствора, мл	Количество сухого яда мг/кг **X**	Количество погибших	Летальность, %	Пробит, **Y**	Весовой коэффициент пробитов, **B**	**X·B**	**X^2·B**	**Y·B**	**X·Y·B**
1	0,1	1,25	2	40	4,75	4,75	5,94	7,42	22,56	28,20
2	0,2	2,50	3	60	5,25	4,75	11,88	29,69	24,94	62,34
3	0,3	3,75	4	80	5,84	3,80	14,25	53,44	22,19	83,22
4	0,4	5,00	5	100	6,64	1,70	8,50	42,5	11,29	56,44
5	0,5	6,25	5	100	6,64	1,70	8,50	42,5	11,29	70,55
						∑ B 16,7	∑ X·B 48,99	∑ X^2·B 175,55	∑ Y·B 92,27	∑ X·Y·B 300,75

Пробит **Y** – находят по таблице (ГФ XI, том 1, стр. 251).

Весовой коэффициент пробитов **B** – находят по таблице:

$$A_1 = \frac{\sum X \cdot Y \cdot B - \frac{\sum X \cdot B \cdot \sum Y \cdot B}{\sum B}}{\sum X^2 \cdot B - \frac{(\sum X \cdot B)^2}{\sum B}} \qquad A_1 = \frac{300{,}75 - \frac{48{,}99 \cdot 92{,}27}{16{,}7}}{175{,}55 - \frac{2\,400}{16{,}7}} \qquad A_1 = 0{,}95$$

$$A_2 = \frac{\sum Y \cdot B - \sum X \cdot B \cdot A_1}{\sum B} \qquad A_2 = \frac{92{,}27 - 48{,}99 \cdot 3{,}22}{16{,}7} \qquad A_2 = 3{,}92$$

LD_{50} = 1,14 мг/кг

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Основываясь на результатах проведенного исследования, летальная доза LD_{50} предоставленного образца сухого яда змеи среднеазиатской гюрзы (*Macroviperae lebetinae turanica*) составила 1,14 мг/кг веса при подкожном введении белым мышам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Holford M., Daly, M., King G.F., Norton R.S. Venoms to the rescue. *Science* 361, 842-844 (2018).
2. Madsen J.M. Toxins as weapons of mass destruction. A comparison and contrast with biological-warfare and chemical-warfare agents. Clin. Lab. Med. 2001;21:593-605. doi:10.1016/S0272-2712(18)30023-4. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
3. Escoubas P., King G.F. Venomics as a drug discovery platform. Expert Rev. Proteom. 2009;6:221-224. doi:10.1586/epr.09.45. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].

Volume: 3 Issue:2 | February–2024 ISSN: 2720-6866
http://journals.academiczone.net/index.php/rjtds

4. King G.F. Venoms as a platform for human drugs: Translating toxins into therapeutics. Expert Opin. Biol. Ther. 2011;11:1469-1484. doi:10.1517/14712598.2011.621940. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
5. Serna N., Sanchez-Garcia L., Unzueta U., Diaz R., Vazquez E., Mangues R., Villaverde A. Protein-Based Therapeutic Killing for Cancer Therapies. Trends Biotechnol. 2018;36:318-335. doi:10.1016/j.tibtech.2017.11.007. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
6. Ovsepian S.V., O'Leary V.B., Ayvazyan N.M., Al-Sabi A., Ntziachristos V., Dolly J.O. Neurobiology and Therapeutic Applications of Neurotoxins Targeting Transmitter Release. Pharmacol. Ther. 2019;193:135-155. doi:10.1016/j.pharmthera. 2018.08.016. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
7. Lewis R.J., Garcia M.L. Therapeutic potential of venom peptides. Nat. Rev. Drug Discov. 2003;2:790-802. doi:10.1038/nrd1197. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
8. Fabbri A., Travaglione S., Falzano L., Fiorentini C. Bacterial protein toxins: Current and potential clinical use. Curr. Med. Chem. 2008; 15:1116-1125. doi:10.2174/092986708784221430. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
9. Doley R., Kini R.M. Protein complexes in snake venom. Cell. Mol. Life Sci.2009;66:2851-2871. doi:10.1007/s00018-009-0050-2. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
10. Ghazaryan N.A., Simonyan K.V., Danielyan M.H., Zakaryan N.A., Ghulikyan L.A., Kirakosyan G.R., Chavushyan V.A., Ayvazyan N.M. Study of the neuroprotective impact and free radical processes of Macrovipera lebetina obtuse snake venom in the model of Alzheimer's disease. Neurophysiology. 2017;49:412-423. doi:10.1007/s11062-018-9704-8. [CrossRef] [Google Scholar].
11. Ayvazyan N.M., O'Leary V.B., Dolly J.O., Ovsepian S.V. Neurobiology and therapeutic utility of neurotoxins targeting postsynaptic mechanisms of neuromuscular transmission. Drug Discov. Today. 2019;24:1968-1984. doi:10.1016/j.drudis.2019.06.012. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
12. Landová E., Bakhshaliyeva N., Janovcová M., Peléšková Š., Suleymanova M., Polák J., Guliev A., Frynta D. Association Between Fear and Beauty Evaluation of Snakes: Cross-Cultural Findings. Front Psychol. 2018;9:333. doi:10.3389/fpsyg.2018.00333. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar].
13. Nikolayskaya I.I., Shalina N.M., Budovski E.I., Method for phosphodiesterase isolation from viper venom, Biokhimiya 28 (1963) 759-763.
14. ГОСТ Р ИСО 10993.11-99 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия. Приложение Б. Методики исследования общетоксического действия.
15. ГФ XI, том 1, стр. 243-251.
16. Романова Е.Б. Разработка методов оценки иммуногенной и биологической активности змеиных ядов. Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии.