



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0017**

Toxikologické účinky hadích jedov vybraných druhov

Zodpovedný riešiteľ **prof. MVDr. Jaroslav Legáth, CSc.**

Príjemca **Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Katedra farmakológie a toxikológie

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Projekt nemal zahraničného spoluriešiteľa. Avšak v rámci experimentov spolupracoval s viacerými zahraničnými inštitúciami.

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

V projekte nebolo plánované podať patentovú prihlášku, vynálezy alebo úžitkové vzory.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

BOCIAN, Aleksandra - CISZKOWICZ, Ewa - HUS, Konrad Kamil - BUCZKOWICZ, Justyna - LECKA-SZLACHTA, Katarzyna - PIETROWSKA, Monika - PETRILLA, Vladimír - PETRILLOVÁ, Monika - LEGÁTH, Ľubomír - LEGÁTH, Jaroslav. Antimicrobial activity of protein fraction from *Naja ashei* venom against *Staphylococcus epidermidis*. In *Molecules*. ISSN 1420-3049, 2020, vol. 25, no. 2, art. no. 293, p. [1-19].

BOCIAN, Aleksandra - SLAWEK, Sonja - JAROMIN, Marcin - HUS, Konrad Kamil - BUCZKOWICZ, Justyna - LYSIAK, Dawid - PETRILLA, Vladimír - PETRILLOVÁ, Monika - LEGÁTH, Jaroslav. Comparison of methods for measuring protein concentration in venom samples. In *Animals*. ISSN 2076-2615, 2020, vol. 10, no. 3, art. no. 448, p. [1-9].

POLLÁKOVÁ, Magdaléna - PETRILLA, Vladimír - ANDREJČÁKOVÁ, Zuzana - PETRILLOVÁ, Monika - SOPKOVÁ, Drahomíra - PETROVOVÁ, Eva. Spitting cobras: Experimental assay employing the model of chicken embryo and the chick chorioallantoic membrane for imaging and evaluation of effects of venom from African and Asian species (*Naja ashei*, *Naja nigricollis*, *Naja siamensis*, *Naja sumatrana*). In *Toxicon*. ISSN 0041-0101, 2021, vol. 189, no., p. 79-90.

DYBA, Barbara - RUDOLPHI-SZYDŁO, Elżbieta - BARBASZ, Anna - CZYŻOWSKA, Agnieszka - HUS, Konrad Kamil - PETRILLA, Vladimír - PETRILLOVÁ, Monika - LEGÁTH, Jaroslav - BOCIAN, Aleksandra. Effects of 3FTx protein fraction from *Naja ashei* venom on the model and native membranes: recognition and implications for the mechanisms of toxicity. In *Molecules*. ISSN 1420-3049, 2021, vol. 26, no. 8, art. no. 2164, p. [1-22].

MANSON, Ernest Z. - MUTINDA, Kyama C. - GIKUNJU, Joseph K. - BOCIAN, Aleksandra - HUS, Konrad Kamil - PETRILLA, Vladimír - LEGÁTH, Jaroslav - KIMOTHU, James H.

Development of an inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) prototype for detecting cytotoxic three-finger toxins (3FTxs) in African spitting cobra venoms. In *Molecules*. ISSN 1420-3049, 2022, vol. 27, no. 3, art. no. 888, p. [1-13].

KUNA, Ewelina - BOCIAN, Aleksandra - HUS, Konrad Kamil - PETRILLA, Vladimír - PETRILLOVÁ, Monika - LEGÁTH, Jaroslav - LEWINSKA, Anna - WNUK, Maciej. Evaluation of antifungal activity of *Naja pallida* and *Naja mossambica* venoms against three candida species. In *Toxins*. ISSN 2072-6651, 2020, vol. 12, no. 8, art. no. 500, p. [1-17].

HUS, Konrad Kamil - MARCZAK, Lukasz - PETRILLA, Vladimír - PETRILLOVÁ, Monika - LEGÁTH, Jaroslav - BOCIAN, Aleksandra. Different research approaches in unraveling the venom proteome of *Naja ashei*. In *Biomolecules*. ISSN 2218-273X, 2020, vol. 10, no. 9, art. no. 1282, p. [1-12].

PETRILLA, Vladimír - POLLÁKOVÁ, Magdaléna - BEKEŠOVÁ, Barbora - ANDREJČÁKOVÁ, Zuzana - VLČKOVÁ, Radoslava - MARCINČÁKOVÁ, Dana - PETRILLOVÁ, Monika - PETROVOVÁ, Eva - SOPKOVÁ, Drahomíra - LEGÁTH, Jaroslav. A comprehensive study monitoring the venom composition and the effects of the venom of the rare ethiopian endemic snake species *Bitis parviocula*. In *Toxins*. ISSN 2072-6651, 2021, vol. 13, no. 5, art. no. 299, p. [1-22].

MANSON, Ernest Z. - MUTINDA, Kyama C. - KIMANI, Josephine - BOCIAN, Aleksandra - HUS, Konrad Kamil - PETRILLA, Vladimír - LEGÁTH, Jaroslav - KIMOTHU, James H. Development and characterization of anti-*Naja ashei* three-finger toxins (3FTxs)-specific monoclonal antibodies and evaluation of their in vitro inhibition activity. In *Toxins*. ISSN 2072-6651, 2022, vol. 14, no. 4, art. no. 285, p. [1-12].

PETERS, Charlotte - PETRILLA, Vladimír - LUPTÁKOVÁ, Lenka - PETROVOVÁ, Eva. The effects of snake venom (*Bitis arietans*) on embryonic development. In *Medical Toxicology*. 1. vyd. - London : IntechOpen, 2021. ISBN 978-1-83880-277-6, s. 47-70.

Uplatnenie výsledkov projektu

Štúdium neurotoxických účinkov jednotlivých zložiek hadích jedov je z medicínskeho hľadiska veľmi významné, ale veľký význam sa pripisuje i cytotoxickému pôsobeniu jednotlivých zložiek hadieho jedu. Poznanie tohto účinku je významné najmä z klinického hľadiska, kde sa využíva pri modifikácii terapeutických postupov po uhryznutiach jednotlivými druhmi hadov, ale aj pri terapii mnohých civilizačných ochorení súčasnosti. Izolované frakcie hadích jedov, ktoré majú neuromodulačné účinky, predstavujú medicínsky významné substancie s potenciálne perspektívnym využitím v modernej medicíne v terapii neurodegeneratívnych ochorení. Veľmi dôležité sú nami preukázané výrazné rozdiely v biochemickom zložení a embryotoxicite jedov v rámci jedného druhu u jedincov žijúcich v rôznych geografických oblastiach. Nami získané výsledky môžu potenciálne nájsť využitie pri výrobe účinnejších antivenínov (protijedov) v snahe o zníženie nárastu nežiadúcich úmrtí, a to nielen dospelých, ale často aj detí, ktoré pre nedostatočnú účinnosť resp. neúčinnosť antivenínov v niektorých geograficky odlišných oblastiach spôsobujú nežiaduce terapeutické komplikácie až smrť postihnutých jedincov. Nami získané výsledky v testoch embryotoxicity preukázali nežiaduce cytotoxické a neurotoxické pôsobenie na experimentálnom modeli kuracieho embrya. Výsledky cytotoxických účinkov jednotlivých frakcií, získané na bunkových kultúrach, poukazujú na možnosť ich využitia vo farmácii pri hľadaní a príprave liečiv s protinádorovými, antibakteriálnymi a antimykotickými účinkami. Získané výsledky nášho projektu z oblasti proteomického zloženia hadieho jedu, opisu toxicity hadieho jedu alebo jeho jednotlivých frakcií, ich interakcie v organizme, predstavujú významný prínos v medicínskom, farmaceutickom ale i kozmetickom priemysle.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Vytýčené vedecké ciele projektu boli počas jeho riešenia splnené. Počas riešenia projektu bolo vykonaných niekoľko experimentov zameraných na proteomické zloženie študovaných hadích jedov, zhodnotenie toxikologického pôsobenia rôznych hadích jedov z rôznych druhov hadov na ranných štádiách kuracích embryí, kde bola sledovaná mortalita, morfológické zmeny, malformácie, orgánová toxicita, organometria a vazoaktivita ciev embrya. Do experimentov boli vybrané toxikologicky významné druhy hadov nielen z rôznych lokalít, ale aj endemické druhy z rôznych klimatických oblastí zeme. Zaznamenali sme výrazné rozdiely v biochemickom zložení a embryotoxicite jedu v rámci jedného druhu

u jedincov pochádzajúcich z rôznych geografických oblastí. Niektoré nami študované hadie jedy, preukázali na ranných štádiách embryí výrazné morfológické zmeny na vnútorných orgánoch, silné vaskulárne poškodenie, čo sa prejavilo i na mortalite embryí.

Stanovenie acetylcholinesterázovej aktivity v pečeni a srdci embryí poukázalo na inhibičný vplyv nami študovaných jedov na jej biochemickú aktivitu. Cytotoxický účinok vybraných hadích jedov sme v experimentoch študovali na nenádorových a nádorových bunkách pričom niektoré frakcie jedu spôsobili pokles metabolickej aktivity nádorových buniek a naopak niektoré frakcie jedu vyvolali výrazný nárast tejto aktivity. Zaujímavé bolo zistenie, že tento účinok nevykazoval závislosť od koncentrácie jedu.

Stanovením biochemického zloženia hadích jedov pomocou elektroforetickej analýzy na agarózových gélových platniach sme dokázali kvalitatívne rozdiely v ich zložení rámci tých istých rodov ako aj druhov skúmaných hadov. Analýzami proteínov sme odhalili, že v niektorých vzorkách jedov kobier boli preukázané hlavné proteínové frakcie tzv. three-finger toxin (3FTx), u ktorých bola dokázaná vysoká afinita na lipidovú časť bunkových membrán. Pri štúdiách fyziologických a biochemických účinkov sa jednoznačne zistilo, že toxický účinok 3FTx na membránovej úrovni následne ovplyvňuje fyziológiu celej bunky. V našich experimentoch sme sa zamerali i na možnosť antimykotického i antibakteriálneho využitia vybraných frakcií hadích jedov. Dokázali sme, že frakcie študovaných hadích jedov majú antimykotické účinky, že niektoré hadie jedy môžu inhibovať rast niektorých patogénnych druhov plesní rodu *Candida* sp. Naopak, prítomnosť extracelulárnych fosfolipáz v hadom jede môže zvýšiť patogenitu plesní rodu *Candida* a obmedziť tak možnosť ich využiť ako potenciálne antifungálne liečivá. V našich experimentoch sme taktiež dokázali antimikrobiálnu aktivitu bielkovinových frakcií hadích jedov na klinicky testovanom kmeni *Staphylococcus epidermidis*. Nami študované frakcie vykazovali synergický účinok so syntetickými antibiotikami a boli účinné tiež pri inhibícii tvorby biofilmu testovanej patogénnej baktérie.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The scientific objectives of the project were met during its implementation. Several experiments were focused on the proteomic composition of the studied snake venoms, the evaluation of the toxicological effects of various snake venoms from different snake species performed on early stages of chicken embryos, where mortality, morphological changes, malformations, organ toxicity, organometry and vasoactivity of the vessels of the embryo were determined during the implementation of this project. Toxicologically important snake species not only from different localities but also endemic species from different climatic regions of the earth were selected for the experiments. We observed significant differences in the biochemical composition and embryotoxicity of the venom within the species in individuals originating from different geographical areas. Some of the snake venoms we examined showed significant morphological changes on the internal organs, severe vascular damage to the embryos at an early-stage, which was reflected in the mortality of the embryo.

The studied venoms, which we investigated in order to determine the activity of acetylcholinesterase in the liver and heart of embryos, showed an inhibitory effect on its biochemical activity.

We studied the cytotoxic effect of selected snake venoms in experiments on non-tumour and tumour cells, while some fractions of the venom caused a decrease in the metabolic activity of tumour cells and, conversely, some fractions of the venom induced a significant increase in this activity. An interesting finding was that this effect showed no dependence on venom concentration.

We demonstrated qualitative differences in the composition of snake venoms when determining the biochemical composition using electrophoretic analysis on agarose gel plates within the same genus and species of studied snakes. Through protein analyses, we revealed that in some cobra venom samples there are major protein fractions, the so-called three-finger toxin (3FTx), which has been shown to have a high affinity for the lipid part of cell membranes. In studies of physiological and biochemical effects, it was clearly demonstrated that the toxic effect of 3FTx at the membrane level subsequently affects the physiology of the whole cell. In our experiments, we also focused on the possibilities of antifungal and antibacterial use of selected fractions of snake venoms. We have proven that

the fractions of the studied snake venoms have antifungal effects and also that some snake venoms can inhibit the growth of some pathogenic species of fungi of the genus *Candida* sp. On the contrary, the presence of extracellular phospholipases in snake venom may increase the pathogenicity of fungi of the genus *Candida* and thus limit the possibility of their use as potential antifungal drugs. In our experiments, we also demonstrated the antimicrobial activity of protein fractions of snake venom on a clinically tested strain of *Staphylococcus epidermidis*. The fractions we studied showed a synergistic effect with synthetic antibiotics and at the same time showed effectiveness in inhibiting biofilm formation of the tested pathogenic bacterium.