



Naja nigricollis. Foto/Photo Richard de Jong.

GIF!

VENOM!

Mátyás Bittenbinder

Een van de meest intrigerende aspecten van de natuur is het bestaan van gif en de evolutie ervan. Binnen de dierenwereld is gif meer dan dertig keer onafhankelijk ontstaan en de wapenwedloop die al miljoenen jaren gaande is tussen predator en prooidier heeft ervoor gezorgd dat er een gigantische variatie is ontstaan in gifsamenstelling en in manieren om gif toe te dienen (Fry *et al.*, 2009).

Gif is feitelijk een cocktail van tientallen eiwitten die toxines worden genoemd en die effect hebben op verschillende lichaamsprocessen zoals de ademhaling, de bloedstolling en de zenuwoverdracht (Harrison *et al.*, 2009; Ainsworth *et al.*, 2018). Zo zijn er toxines die de ademhalingspijpen of de hartspier kunnen verlammen, bloedvaten kapot kunnen maken en weefsel schade kunnen veroorzaken. Ironisch genoeg lenen deze toxines zich vanwege hun hoge mate van selectiviteit en werkzaamheid echter ook als veelbelovende kandidaten voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. In de afgelopen decennia heeft onderzoek naar gif voor tal van wetenschappelijke en medische doorbraken gezorgd. Zo vormt een eiwit uit het gif van de Zuid-Amerikaanse lanspuntslang (*Bothrops jararaca*) de basis voor een medicijn voor de behandeling van hoge bloeddruk dat wereldwijd door miljoenen mensen wordt gebruikt en is uit het gif van de zaagschubadder (*Echis carinatus*) een medicijn ontwikkeld dat gebruikt wordt bij de behandeling van *angina pectoris*, een hartaandoening waarbij de kranslagader vernauwd is (McCleary & Kini, 2013).

Naast het onderzoek naar giftige dieren vanwege hun mogelijke potentie voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen, worden deze

Mátyás Bittenbinder

The evolution of venom is possibly one of nature's most intriguing aspects. Within the animal world, venom has emerged independently more than 30 times and the predator-prey arms race that has been going on for millions of years has caused a huge variation in venom composition and venom delivery systems (Fry *et al.*, 2009).

Venom can be seen as a cocktail of dozens of proteins called toxins that are capable of disrupting physiological activities such as respiration, blood clotting and nervous transfer (Harrison *et al.*, 2009; Ainsworth *et al.*, 2018). There are toxins that can paralyze respiratory muscles or the muscle of the heart, destroy blood vessels and cause tissue damage. Ironically, because of this high selectivity and efficacy, these toxins also present themselves as promising candidates for the development of new drugs. In recent decades, research into venom has led to numerous scientific and medical breakthroughs. The venom of the jararaca (*Bothrops jararaca*) has formed the basis for a medicine used by millions of people worldwide for the treatment of high blood pressure, whereas toxins in the venom of the Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) are being used for treating *angina pectoris*, the obstruction of the arteries that supply blood to the heart muscle (McCleary & Kini, 2013).

In addition to venom research being done because of their potential use in alternative drug design, venomous animals are being studied in order to better understand the effect their venoms have on potential bite victims. With the ever-increasing human population, humans and animals come into contact more and more of-

dieren onderzocht om het effect van hun gif op het menselijk lichaam beter te begrijpen. Met de almaar toenemende bevolkingsgroei wereldwijd komen mens en dier vaker met elkaar in aanraking. Bij dergelijke confrontaties komt het geregeld voor dat mensen worden gebeten en vaak zijn hierbij slangen in het geding. Van de ongeveer 700 giftige slangensoorten zijn er maar enkele tientallen die het grootste deel van het probleem veroorzaken. Jaarlijks worden zo'n 1,5 miljoen mensen door een gifslang gebeten. Hiervan overlijden jaarlijks 81.000 tot 138.000 en houden nog eens 400.000 mensen ernstige verwondingen over aan de gevolgen van een beet, waaronder amputatie, blindheid en schade aan het zenuwstelsel (Gutiérrez *et al.*, 2017). De landen waar gifslangen de grootste schade aanrichten, zijn vaak ook de gebieden waar men geen geld heeft voor een adequate behandeling.

Want om de schadelijke effecten van slangen-gif tegen te gaan, is een zogeheten antiserum nodig. Antiserum bestaat uit antilichamen die zijn verkregen uit een dier (paard of schaap) dat geïmmuniseerd is met het gif van een bepaalde slangensoort. De antilichamen in dit serum zijn specifiek tegen soortgelijke toxines in het gif. Alhoewel antigif al meer dan honderd jaar wordt gebruikt en op dit moment de enige effectieve behandeling is, kleeft er een aantal nadelen aan waaronder een hoge prijs, variatie in kwaliteit en beperkte specificiteit (slechts 5-36% van de immuniserende antilichamen in het antiserum is gericht op de toxines in het gif) (Laustsen *et al.*, 2016). Wetenschappelijk onderzoek naar de verbetering van antigif en het vergroten van onze kennis over slangengif zijn dus van zeer groot belang.

In het onderzoek waarover ik hieronder beknopt zal uitweiden, is gekeken naar het gif van de koraalslangachtigen (familie: Elapidae). Deze familie bevat een aantal beroemde, beruchte, maar bovenal prachtige slangensoorten, zoals de zwarte mamba (*Dendroaspis polylepis*), de koningscobra (*Ophiophagus hannah*) en de inlandtaipan (*Oxyuranus microlepidotus*).

ten. During these confrontations people regularly get bitten and this mostly involves snakes. Worldwide there are around 700 venomous snake species of which only a few dozen are causing the majority of problems. Every year approximately 1.5 million people get bitten by a venomous snake and between 81,000 and 138,000 die from these bites. Of those who survive, 400,000 suffer from serious injuries caused by the venom effects including amputation, blindness and nerve damage (Gutiérrez *et al.*, 2017). The people most affected are farmers or shepherds living in remote areas in developing countries and often have little to no money for appropriate treatment.

Nowadays the only effective treatment capable of counteracting the harmful effects of snake venom involves the administration of antivenom. Antivenom consists of antibodies obtained from an animal (horse or sheep) that has been immunized with the venom of a certain snake species. The antibodies in this serum are specific to certain venom toxins. Although antivenom has been used for over 100 years, it has a number of disadvantages including a high price, variation in quality and limited specificity (only 5-36% of the immunizing antibodies in the antiserum are targeted against the venom toxins) (Laustsen *et al.*, 2016). Scientific research is therefore of great importance in order to improve the quality and efficacy of conventional antivenom and to increase our knowledge regarding snake venom.

The study on which I will briefly elaborate below focused on the venoms of coral snakes and allies (family: Elapidae). This family contains a number of famous and notorious but above all beautiful snake species including the black mamba (*Dendroaspis polylepis*), king cobra (*Ophiophagus hannah*) and inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*).

The venom of coral snakes and allies mainly consists of neurotoxic molecules that attack the nervous system. These are also the toxins that cause the most damage and can lead to

Het gif van koraalslangachtigen bestaat voornamelijk uit neurotoxische moleculen die het zenuwstelsel aanvallen. Dit zijn tevens de toxines die de meeste schade toebrengen en zelfs tot de dood kunnen leiden, mede doordat ze verlamming kunnen veroorzaken, of de ademhaling kunnen stoppen. Het gif van deze slangen bevat echter ook moleculen die effect hebben op de bloedstolling en die interne bloedingen kunnen veroorzaken. Ondanks het feit dat de effecten van deze zogeheten coagulotoxines ook levensgevaarlijk kunnen zijn, is naar deze eigenschap van het gif aanzienlijk minder onderzoek gedaan.

Om de kenniskloof met betrekking tot de coagulotoxische effecten van het gif van koraalslangachtigen op te vullen, hebben we gekeken naar het gif van dertig Afrikaanse en Aziatische koraalslangachtigen en het effect van dit gif op de bloedstolling. Dit hebben we gedaan met behulp antistollingsassays die we *in vitro* (letterlijk: in glas; buiten het lichaam van een organisme) hebben uitgevoerd. Op deze manier kon de relatieve remming van een aantal specifieke bloedstollingsfactoren worden bepaald.

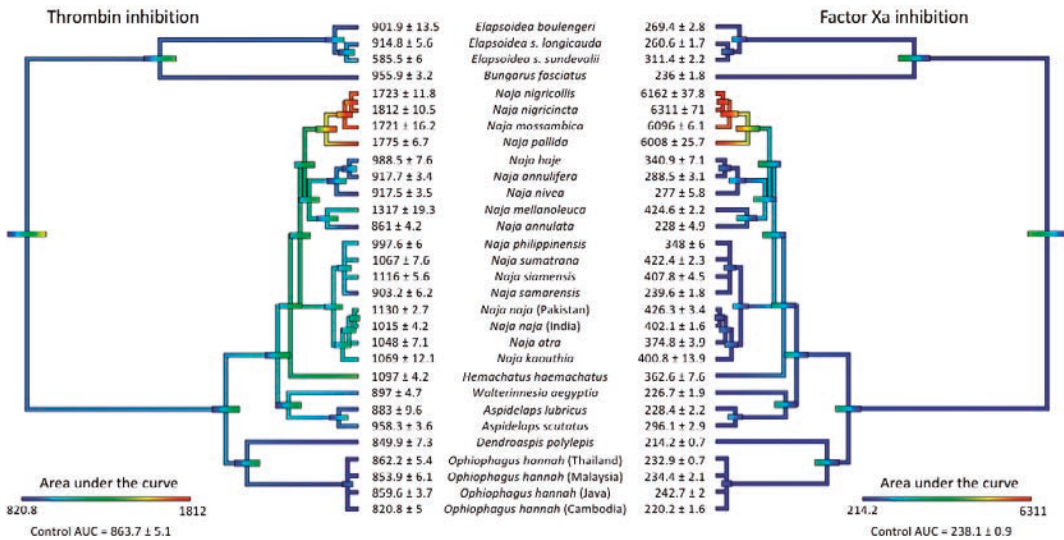
Uit de resultaten blijkt dat spugende cobra's van het Afrikaanse continent in staat zijn om factor Xa en trombine - twee belangrijke bloedstollingsfactoren - te remmen. Beide stollingsfactoren spelen een rol bij het laatste gedeelte van de bloedstollingcascade, waarbij fibrinogeen - een andere stollingsfactor - wordt omgezet in fibrine. In gezonde toestand vormt fibrine vervolgens een netwerk van draden en in combinatie met bloedplaatjes zorgen ze voor het dichten van een wond door de vorming van een stolsel. Dit betekent dus, dat wanneer bepaalde toxines in het slangengif ervoor zorgen dat de trombine en factor Xa worden geremd, dit uiteindelijk resulteert in bloed dat niet meer kan stollen, met alle gevolgen van dien. Dit is dan ook de oorzaak van de lokale en interne bloedingen die bij patiënten worden waargenomen. In figuur 1 is te zien dat het antistollings-effect specifiek wordt gevonden in het gif van vier Afrikaanse spugende cobrasoorten (*Naja*

death, partly because they can cause paralysis or respiratory failure. However, the venom from these snakes also contains molecules that can affect blood clotting and can cause internal bleeding. Despite the fact that the effects of these so-called coagulotoxins can also be life-threatening, considerably less research has been done into this part of the venom.

To fill the knowledge gap regarding the coagulotoxic effects of these venoms we studied the venoms of 30 African and Asian elapid snake species and how these affect the blood coagulation. This was done using anticoagulation assays that were carried out *in vitro* (literally: in glass; outside the body). In this way the relative inhibition of a number of specific blood coagulation factors could be determined.

Our results show that spitting cobras from the African continent are capable of inhibiting factor Xa and thrombin - two important blood coagulation factors. Both coagulation factors play a role in the last part of the blood coagulation cascade, where fibrinogen - another coagulation factor - is converted into fibrin. Under normal circumstances, fibrin then forms a network of fibrin strands and combines with platelets to ensure that a wound is closed by forming a fibrin clot. This means that when certain toxins in the snake venom cause inhibition of thrombin and factor Xa, this will result in blood that can no longer coagulate, with all its consequences. This is therefore the cause of the local and internal bleeding that is observed in patients. Figure 1 shows us that the anticoagulant effect is specifically found in the venom of four African spitting cobra species (*Naja nigricollis*, *Naja nigricincta*, *Naja mossambica* and *Naja pallida*). This figure also shows that the inhibitory effect of the toxins on factor Xa is stronger than on thrombin.

We then looked at whether it is possible to prevent the strong anticoagulant effect of these four species with existing antivenom. We used SAIMR Polyvalent Snake Antivenom, an antiserum that is widely used in sub-Saharan Africa



Figuur 1 / Figure 1. Fylogenetische reconstructie van de remming van twee bloedstollingsfactoren. Een overzicht van de distributie van de remming van trombine en factor X, gebaseerd op de AUC waarden (area under the curve) van de dosis-responsie grafieken voor beide stollingsfactoren. Warmere kleuren geven een hogere antistollingspotentie weer. Fylogenie gebaseerd op [Wüster et al. (2007)]. Phylogenetic reconstruction thrombin and factor Xa inhibition. An overview of the distribution of thrombin and factor Xa inhibition, based on AUC (area under the curve) values derived from dose-response curves for both clotting factors. Warmer colours represent a higher anticoagulant effect. Phylogeny based upon [Wüster et al. (2007)].

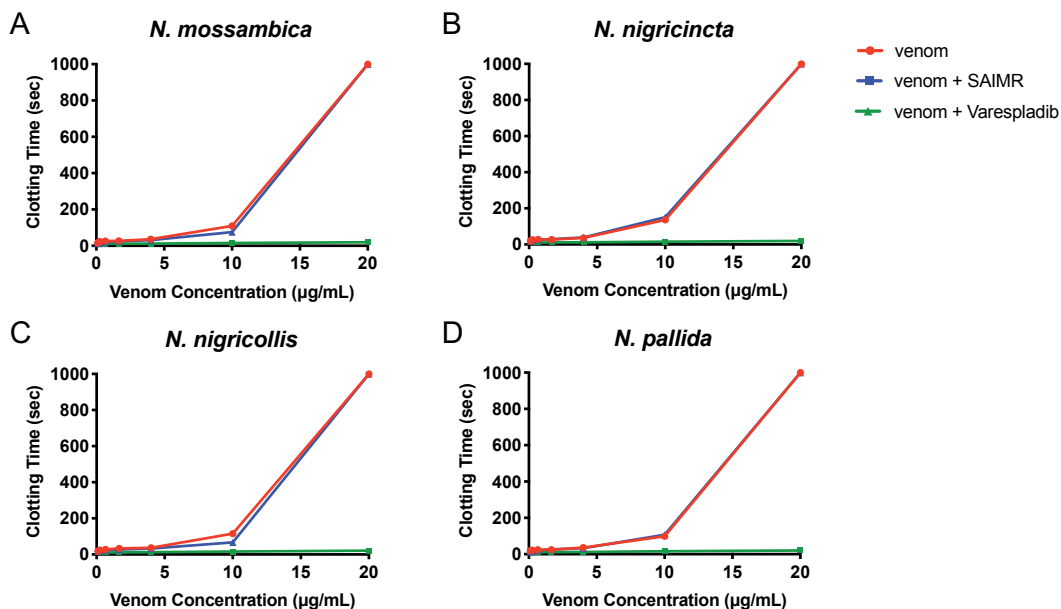
nigricollis, *Naja nigricincta*, *Naja mossambica* en *Naja pallida*). In deze figuur is ook te zien dat het remmende effect van de toxines op factor Xa sterker is dan op trombine.

Vervolgens hebben we gekeken of het mogelijk is om het sterke antistollingseffect van deze vier soorten te voorkomen met bestaand anti-gif. We hebben hierbij gebruikt gemaakt van SAIMR Polyvalent Snake Antivenom, een anti-gif dat veel wordt gebruikt in Afrika beneden de Sahara en waarvan bekend is dat het de neurotoxines effectief neutraliseert. De resultaten laten echter een schokkend beeld zien: ook al werkt het anti-gif goed tegen de neurotoxische effecten, het is niet in staat de antistollingseffecten te voorkomen (zie figuur 2). Het anti-gif dat duizenden slachtoffers jaarlijks krijgen toegediend, is dus maar gedeeltelijk in staat de effecten van het gif te neutraliseren.

We hebben vervolgens gekeken naar de effecten van een middel, genaamd Varespladib. Het

and that is known to effectively neutralize neurotoxins. However, the results show a shocking effect: even though the antivenom works well against the neurotoxic effects, it seems unable to prevent the anticoagulant effects (see Figure 2). This shows us that the antivenom that thousands of victims receive each year is therefore only partially able to neutralize the effects of the venom.

We then looked at the effects of a substance called Varespladib, a drug candidate that was tested a few years ago as a potential therapy for various types of inflammatory diseases. The reason we have looked at this molecule is that it is able to neutralize the effects of an enzyme called phospholipase A. In our body this enzyme is found in the large intestine, where it breaks down cell membranes. The venoms of the species that were tested contain toxins capable of producing a similar effect. After adding Varespladib it was found that the anticoagulant effects were almost completely neutralised (Fig-



Figuur 2 / Figure 2. Dosis-responscurves voor het neutraliserend effect van SAIMR-antigen en Varespladib. Dosis-responsgrafieken die het remmende effect weergeven van het gif van vier Afrikaanse spugende cobra's op factor Xa, een van de bloedstollingsfactoren (rode lijn). Daar-naast de resultaten die het neutraliserend effect van het SAIMR-antigen (blauw) en Varespladib (groen) laten zien. X-as: gifconcentratie ($\mu\text{g/ml}$); Y-as: stollingstijd in seconden. De negatieve controle voor trombine betrof $43,4 \pm 0,6\text{s}$; de negatieve controle voor factor Xa $11,9 \pm 0,1\text{s}$. De individuele datapunten geven het gemiddelde en de standaardafwijking voor $N=3$ (in drievoud). Voor de meeste datapunten zijn de foutbalken niet zichtbaar, omdat deze kleiner zijn dan de weergegeven lijn.

Dose-response curves for the neutralising effect of SAIMR antivenom and Varespladib. Dose-response curves representing the inhibiting effect of the venom of four African spitting cobras on factor Xa, a blood clotting factor (red line). The figure further shows the neutralising effects of SAIMR antivenom (blue line) and Varespladib (green line). X axis: venom concentration ($\mu\text{g/ml}$); y axis: clotting time in seconds. The negative control values for thrombin were $43,3 \pm 0,6\text{ s}$. Negative control values for factor Xa were $11,9 \pm 0,1\text{ s}$. Data points are mean and standard deviations for $N = 3$ (in triplicate). Note that for most data points, the error bars are smaller than the line icon.

gebruik ervan is een aantal jaar geleden getest als potentiële therapie voor verschillende typen ontstekingsziekten. De reden dat we naar dit molecuul hebben gekeken, is dat het in staat is de effecten van een enzym, genaamd fosfolipase, te neutraliseren. In ons lichaam komt dit enzym voor in de dikke darm, waar het zorgt voor de afbraak van celmembranen. Het gif van de soorten die we getest hebben, bezitten toxines die een vergelijkbaar effect teweeg kunnen brengen. Na het toevoegen van Varespladib bleek dat de antistollingseffecten vrijwel volledig teniet werden gedaan (figuur 2). Dit resultaat komt overeen met eerdere studies waarbij het neutraliserend effect op neurotoxines is aangetoond (Lewin *et al.*, 2016). De resultaten

ure 2). These results are supported by previous studies demonstrating a clear neutralising effect on neurotoxins (Lewin *et al.*, 2016). However, the results from our study show for the first time the ability of Varespladib to prevent anticoagulant effects. The effectiveness of this medicine makes it a promising candidate for the development of affordable and easily available drugs for the treatment of snake bites.

For example, it could be used as a bridge before the victim arrives at the hospital, or it could be combined with conventional antivenom for a broader and more extensive treatment. Until that is the case, future studies need to look at the possible side effects, the efficacy of differ-

GIF!

uit onze studie tonen echter voor het eerst het vermogen van Varespladib aan om antistollingseffecten te voorkomen. De effectiviteit van dit middel maakt het een veelbelovende kandidaat voor de ontwikkeling van betaalbare en gemakkelijk verkrijgbare medicijnen voor de behandeling van slangenbeten.

Zo zou het gebruikt kunnen worden als overbrugging, voordat het slachtoffer in het ziekenhuis aankomt, of het zou kunnen worden gecombineerd met conventioneel antigif voor een bredere en uitgebreidere behandeling. Voor het zover is, moet in toekomstige studies nog worden gekeken naar de mogelijke bijwerkingen, de werkzaamheid van verschillende manieren van toediening (oraal en injectie), doseringsschema's en de werkzaamheid in combinatie met antigif.

De resultaten van ons onderzoek verschaffen kennis over het moleculaire mechanisme van de antistollingseffecten in het gif van deze cobra's en hebben laten zien dat Varespladib mogelijk kan helpen bij het behandelen van deze effecten. Daarnaast is onze kennis van het gif van Afrikaanse spugende cobra's vergroot, waarmee de klinische behandeling van slachtoffers verbeterd kan worden.

De resultaten van ons onderzoek zijn inmiddels gepubliceerd in het wetenschappelijke tijdschrift *Toxins* (<https://doi.org/10.3390/toxins10120516>).

ent routes of administration (oral and injection), dosing regimens and the efficacy in combination with antidote.

The results of our research provide knowledge about the molecular mechanism of the anticoagulant effects in the venom of these cobras and have shown that Varespladib could possibly help to treat these effects. In addition, our knowledge of the venom of African spitting cobras has increased, which can improve the clinical treatment of victims.

The results of our research have been published in the scientific journal *Toxins* (<https://doi.org/10.3390/toxins10120516>).

Referenties - References

- Fry, B.G.; Roelants, K.; Champagne, D.E.; Scheib, H.; Tyndall, J.D.A.; King, G.F.; Nevalainen, T.J.; Norman, J.A.; Lewis, R.J.; Norton, R.S.; Renjifo, C.; Rodríguez de la Vega, R.C., 2009. The Toxicogenomic Multiverse : Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 2009(10): 483-511.
- Harrison, R.A.; Hargreaves, A.; Wagstaff, S.C.; Faragher, B.; Laloo, D.G. Snake envenoming: A disease of poverty. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009, 3.
- Ainsworth, S.; Petras, D.; Engmark, M.; Süßmuth, R.D.; Whiteley, G.; Albulescu, L.O.; Kazandjian, T.D.; Wagstaff, S.C.; Rowley, P.; Wüster, W.; Dorrestein, P.C.; Arias, A.S.; Gutiérrez, J.-M.; Harrison, R.A.; Casewell, N.R.; Calvete, J.J., 2018 The medical threat of mamba envenoming in sub-Saharan Africa revealed by genus-wide analysis of venom composition, toxicity and antivenomics profiling of available antivenoms. *Journal of Proteomics* 172: 173-189.
- McCleary, R.J.R.; Kini, R.M., 2013. Non-enzymatic proteins from snake venoms: A gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon* 62: 56-74.
- Gutiérrez, J.M.; Calvete, J.J.; Habib, A.G.; Harrison, R.A.; Williams, D.J.; Warrell, D.A., 2017. Snakebite envenoming. *Nature Reviews Disease Primers* 3: 17063.
- Laustsen, A.; Engmark, M.; Milbo, C.; Johannesen, J.; Lomonte, B.; Gutiérrez, J.; Lohse, B., 2016. From Fangs to Pharmacology: The Future of Snakebite Envenoming Therapy. *Current Pharmaceutical Design* 22: 5270-5293.
- Lewin, M.; Samuel, S.; Merkel, J.; Bickler, P. Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. *Toxins (Basel)*; 2016(8, 248).
- Wüster, W.; Crookes, S.; Ineich, I.; Mané, Y.; Pook, C.E.; Trape, J.-F.; Broadley, D.G., 2007. The phylogeny of cobras inferred from mitochondrial DNA sequences : Evolution of venom spitting and the phylogeography of the African spitting cobras (Serpentes : Elapidae : *Naja nigricollis* complex) 45: 437-453.