

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului
“Regele Mihai I al României” din Timișoara



Facultatea de Medicină Veterinară Timișoara

KOCSIS RUDOLF

TEZĂ DE DOCTORAT

O PERSPECTIVĂ FARMACO-TERAPEUTICĂ ÎN BOLI CU
INCIDENȚĂ RIDICATĂ LA REPTILE ȘI VENINUL DE
ȘARPE: STRUCTURĂ ȘI POTENȚIAL ÎN MEDICINĂ

Conducător științific

Prof. dr. CRISTINA ROMEO TEODOR

Timișoara

2018

Rezumatul tezei de doctorat

O perspectivă farmaco-terapeutică în boli cu incidență ridicată la reptile și veninul de șarpe: structură și potențial în medicină

Prezenta teză conține:

Lista de abrevieri

Rezumatele în limba Română și Engleză

Parte de cercetări bibliografice: 26 pagini

Parte de cercetări proprii: 123 pagini

Tabele: 9

Figuri: 191

Surse bibliografice: 152

Domenii de studiu: *medicină veterinară, biologie, zoologie*

Subdomeniile: *farmacologie, terapie, boli medicale, toxicologie, herpetologie*

Cuvinte cheie: *reptilienii, patologie, farmaco-terapeutică, veninuri, proteomică.*

Motivația alegerii temei de cercetare

Tema tezei este situată la granița dintre mai multe domenii: biologie - zoologie - medicină veterinară, și prezintă un interes semnificativ pentru subdomeniul herpetologiei și medicinei acestor vietăți fascinante, un subiect pe cât de interesant pe atât de puțin cunoscut (încă) în România.

Din acest considerent tema de cercetare propusă poate fi considerată oportună cu un potențial important de cunoaștere adăugată pentru științele medical-veterinare. Cu excepția unor cursuri de perfecționare a resurselor umane, din cunoștințele noastre, o cercetare cuprinzătoare de doctorat, strict pe acest topic al medicinei reptilienilor nu a fost publicată la noi (sau, dacă au apărut, diverse materiale pe acest topic sunt incomplete, vechi, sau conțin date neactualizate) și de aici necesitatea unei cercetări de doctorat.

Importanța și actualitatea temei

Fascinația pe care o aduc reptilele oamenilor, face ca tot mai numeroși tineri, mai ales, să devină extrem de pasionați de acest gen de animale. Azi acest fapt poate fi observat ușor, dezvoltarea fără precedent a preocupărilor legate de reptile: expoziții, pet-shop-uri dedicate, parcuri tematice, emisiuni TV, cursuri și prezentări tematice etc. fiind în mare vogă astăzi, subliniind actualitatea prezentei teme de doctorat.

În acest sens, în Europa, “*marele interes*” pentru acest topic are în spate o afacere de milioane de euro / an și, din acest considerent, odată cu creșterea numărului de reptile din terarii, apare tot mai acut nevoia de cunoaștere unde, pe lângă întreținerea și hrănirea acestor animale, sunt tot mai căutate de către proprietari și practicienii veterinari și informațiile despre, modul de manipulare, patologia, tehnicile terapeutice sau medicația specifică care trebuie administrată reptilienilor. Deci, cunoașterea metodologiilor clasice și moderne de investigare a principalelor entități morbide dar și a mijloacelor de intervenție terapeutică eficientă asupra reptilienilor este un domeniu unde încă există largi zone de necunoaștere. Din acest considerent tema este de interes.

În conformitate cu instrucțiunile în vigoare teza este compusă din două părți mari:

- *Partea generală – Stadiul actual al cunoașterii și*
- *Cercetările proprii*

Partea generală

Stadiul actual al cunoașterii

Este extinsă pe 26 de pagini și structurată în două capitole, respectiv:

Capitolul 1 unde se fac scurte memorări despre filogenia, clasificarea principalelor ordine reptiliene.

Reptilienii sunt clasificați în patru ordine mari: *Testudines* (Chelonieni), *Sphenodontia* (Tuatara), *Squamata* (Șopârle și Șerpi și *Crocodylia* (Crocodili, Aligatori și Gaviali), principalele caracteristici ale acestora sunt fiind descrise punctual.

Capitolul 2 este dedicat tehnicilor de manipulare, fixare și recoltare a veninului de la șerpi, cu descrieri ale: Încadrării taxonomice a șerpilor veninoși, tipuri de dinți la șerpi, manipularea șerpilor veninoși în clinica veterinară

Echipe și tehnici de manipulare. Deasemenea sunt descrise metodologia extracției veninului, manipularea și depozitarea veninului dar și elemente importante despre veninul de șarpe (principalele componente din venin, efectele veninului de șarpe, doza LD₅₀ la venin și unele aplicații ale veninului în medicină.

Cercetările proprii

Această parte se extinde pe 123 de pagini și este compus din:

Capitolul 3. Contribuții în abordarea farmaco-terapeutică în bolile reptilienilor

cu două subcapitole respectiv:

A. Studiul farmaco-terapeutic al principalelor entități morbide la reptile și

B. Studiul încărcăturii bacteriene și a eficienței terapiei antiinfecțioase la reptile

Locul efectuării studiului

Studiile A și B au fost efectuate în cadrul clinicilor Dr. Nagy și Dr. Kocsis din Bärenbronn, Wüstenrot Germania în perioada: **01.08.2013 – 26.09.2017** pe un total de **389** de cazuri, respectiv:

Studiul A.

- 166 broaște țestoase;
- 98 șerpi (veninoși / neveninoși: 39/59) și
- 125 șopârle.

În tabelul 1 din teză este redată situația generală / categorii de boli specifice tratate / specii luate în studiu.

Studiul B.

Din totalul de 389 de cazuri de reptile examinate luate în studiu, pentru monitorizarea eficienței tratamentelor și a identifica eventuale forme de rezistență la antiinfecțioasele utilizate, au fost individualizate 25 de cazuri / specii de reptile dintre cele cu tratamente de durată și fără ameliorare clinică după cum urmează:

- două specii de broaște țestoase,
- opt specii de șopârle și
- cincisprezece specii de șerpi.

Probele au fost colectate din:

- *cavitatea orală,*
- *tractul respirator,*
- *răni de piele,*
- *abcese și*
- *fecale.*

Metodologie

Studiul A. Mijloacele de investigație și tratament din prezenta teză au fost cele clasice cunoscute, respectiv investigația clinică, de laborator, citohistologică și imagistică (imaginile Röntgen au fost efectuate cu un X-ray portabil, model Atomscope 803 (DLC), pentru tratamente fiind aplicate principiile alopatiei.

Studiul B. Metoda utilizată pentru stabilirea gradului de sensibilitate a tulpinilor bacteriene identificate a fost metoda antibiogrammei, prin tehnica *MIC = Minimal Inhibition Concentration*, efectuată în cadrul laboratorului acreditat Synlab Vet – Labor din Leverkusen Germania.

Scopul studiului a fost de releva cele mai importante aspecte legate de:

- descrierea patologiei specifice a reptilelor;
- descrierea / inventarierea celor mai eficiente mijloace terapeutice utilizabile de către specialiști în entitățile morbide ale acestor vietăți;
- identificarea principalelor genuri bacteriene / virale care au generat afecțiuni la reptile;
- identificarea fenomenului de rezistență la antiinfecțioasele utilizate.

În primul studiu; **A. Studiul și farmaco-terapeutic al principalelor entități morbide la reptile** sunt descrise cele mai reprezentative cazuri și tratamente pe categorii de reptile, în perioada monitorizării.

Astfel sunt prezentate bolile de natură:

a. medicală:

- **afecțele dermatologice la reptile:** dificultățile de năpârlire (*dysecdysis*), malformația ciocului la broasca țestoasă, necroza plastronului la broasca țestoasă, boala veziculoasă la viperă, Hematomul în regiunea metatarsală și subcutanat, traumatismul cozii la șopârle, plăgile prin mușcătură la țestoase, papilomatoza, emfizemul subcutanat, dermatita și paniculita, abcese etc. la șopârle;
- **bolile asociate organelor de simț:** hipovitaminoza A la broasca țestoasă, conjunctivita unilaterală și bilaterală la broștele țestoase și șopârle, cheratoconjunctivită post hibernală la broască țestoasă, atrofia oculară post hibernală, inflamația intraorbitală la *Bitis gabonica*, otita medie bilaterală purulentă și traumatismul ocular la *Trachemys scripta elegans* etc.;
- **bolile asociate sistemului digestiv:** acumularea orală la agama cu barbă, stomatita și sinuzita la agama de apă, stomatită bacteriană la agame și la broăștele țestoase, tartrul dentar la agame, stomatita purulentă și abscesul în regiunea rostrală la *Boa constrictor*, anorexia la gecko leopard și la *boa constrictor*, steatoza hepatică și chiștii biliari la agame, dilatația gastrică de natură necunoscută la șerpi, hemoragia hepatică subcapsulară la agame, corpii străini în stomac la broască țestoasă, megadolicocolonul la agame, obstrucția intestinală cu talaș la cameleon, ileusul intestinal la iguane.
- **virozele, bacteriozele și parazitozele:** paramyxoviroza la *Boa constrictor*, *Bitis nasicornis* și *Bitis arietans*, infecția esofagiană purulentă la *Corallus caninus*, constipația de origine parazitară la șopârle, obstrucția intestinală post hibernală cauzată de oxiuroza la broăștele țestoase, obstrucția intestinală cu ascarizi, paraziții cel mai frecvent întâlniți la reptile, pentastomoza, enterita bacteriană și micotică la șopârle, cromomicoză și capilarioză, candidoză pulmonară la vipere, acarioza la agame.
- **bolile asociate sistemului respirator și cardio-vascular:** traheitele, pneumonia și pneumonia necrotico-purulentă la șerpi și șopârle
- **bolile asociate sistemului urinar:** guta articulară, renalo-viscerală la cameleoni și șerpi, insuficiența renală și retenția urinară la broăștele țestoase
- **bolile asociate aparatului reproducător:** distocia (post-ovulatorie) la șopârle, broaște țestoase și șerpi, staza și calcifierea foliculară la șerpi și distociile pre-ovulatorii la agame, distocia postovulatorie la broăștele țestoase, prolapsul penian la broasca țestoasă, hemipenian la șerpi și agame, prolapsul oviductului la broască țestoasă și cloacal la agame, inflamația și ulcerul cloacal la broaște țestoase.
- **bolile asociate aparatului osos și muscular:** fractura tibio-fibulară, toracală la șopârle, osteodistrofiile la agame și iguane, osteomalacia la cameleoni, gangrena și necroza musculară

b. tumorală

- melanomul și melanocitomul spino-celular la agame,
- formațiunile neoplazice bucale și polipul fibroepitelial al cavității orale la agame
- tumori multiple: carcinomul spinocelular, tumorile cutanate la șerpi
- neoplaziile maligne de origine mezenchimală a celulelor fusiforme la agame

c. chirurgicală

- prolapsul cloacal la șerpi și șopârle,
- enterectomia la șerpi,
- amputarea membrului la șopârlă și broasca țestoasă

d. Intoxicațiile

- intoxicația cu permetrină la agame.

După prezentarea principalelor entități patologice și scheme de tratament preconizate, în subcapitolul 3.3.5. s-a efectuat analiza statistică a datelor din studiul farmaco-terapeutic.

În figurile 183-187 din teză sunt redate rezultatele analizei statistice pe tipuri de afecțiuni și specii de reptile și corelațiile statistice efectuate cu ajutorul programului *ANOVA*, conform *Tukey's Multiple Comparison Test*, pe care l-am considerat cel mai potrivit pentru analiza acestui tip de rezultate. Pentru ajustarea probabilităților interspecii reptiliene s-a utilizat *Bonferroni's Multiple Comparison Test*. Această corecție ajustează probabilitățile (p) din cauza riscului crescut de eroare de tip I la efectuarea testelor statistice multiple. Astfel, din cele 389 de cazuri studiate au fost identificate nouă entități morbide majore. Încercând un top cinci al entităților morbide care afectează toate speciile de reptile autorul a identificat în ordine boli de natură:

- [1] digestivă
- [2] dermatologică
- [3] respiratorie
- [4] SNC și ale organelor de simț
- [5] reproductivă

Acestea au fost însoțite de alte patru, dar într-o proporție mult mai redusă:

- [6] ale aparatului osteo-muscular (de natură medicală / traumatică)
- [7] ale aparatului urinar
- [8] tumori
- [9] intoxicații

Rezultatele analizei au relevat *corelații statistice semnificative* în ceea ce privește ordinea incidenței bolilor / speciile de reptile, comparativ cu toate speciile și bolile indentificate, boli digestive / celelalte boli luate în studiu fiind clar importante din punct de vedere practic ($** p < 0.01$) (Fig. 183 teză).

Comparația incidenței bolilor digestive față de celelalte boli diagnosticate în studiu au relevat valori statistice înalt semnificative (media \pm SEM) ($*** p < 0.001$) (Fig. 184 teză). Distribuția comparativă a bolilor / nr. caruri / specia de reptilă / tipuri de boală a relevat deasemena valori semnificative statistic și înalt semnificative statistic (Fig. 185 teză) pentru situațiile:

- *chelonieni / șerpi veninosi și neveninoși* ($*** p < 0.001$);
- *șopârle / șerpi veninosi / neveninosi* ($**p < 0.01$ și respectiv $*** p < 0.001$)

Analizând legatura dintre specia de reptilă și principalele două boli (de natură digestivă și dermatologică) are au apărut în cazuistica studiată am observat că incidența apariției bolilor digestive (cel mai des întâlnite) și a bolilor de piele (al doilea cel mai des întâlnite) (Fig. 186 teză) a fost comparativ crescută la speciile:

- *chelonieni / șerpi* ($** p < 0.01$);
- *șopârle / șerpi* $## p < 0.01$;
- *șopârle / chelonieni și șerpi* ($** p < 0.01$)

Corelațiile comparative între specia de reptilă / tipul de boală pentru chelonieni / șerpi / șopârle fiind înalt semnificativă statistic ($*** p < 0.001$) (Fig. 187 teză) ceea ce, în acest caz, justifică aprecierea că dintre speciile de reptile cele mai sensibile sunt în ordine:

- *broaște țestoase*
- *șerpi veninoși*
- *șerpi neveninoși*
- *șopârle*

În cel de-al doilea studiu din acest capitol a fost urmărită ***B. încărcătura bacteriană și eficiența terapiei antiinfecțioase efectuate la reptile***

Reptilele pot fi adesea rezervoare pentru o varietate mare de bacterii care adesea sunt transmise altor animale de companie și chiar oamenilor. Fenomenul rezistența antimicrobiene este deci prezent și la reptile, tendința generală a acestui fenomen fiind de continuă creștere. O motivație ar putea fi și necunoașterea celor mai potrivite remedii (grupe) de farmaci antiinfecțioși / entitatea clinică, ceea ce determină utilizarea aceluiași tip de antibiotic pentru perioade lungi de timp, efectuarea antibiogrammei ca metodologie curentă de decelare al celui mai bun remediu antiinfecțios fiind, cel puțin la noi în țară, încă la începuturi.

Au fost procesate în total **43 de probe**, pe medii pentru bacterii aerobe sau anaerobe. În tabelul 3 din teză sunt prezentate rezultatele antibiogramelor / specii bacteriene și antibioticele la care tulpinile au fost testate pentru rezistență. Cele mai frecvent izolate bacterii din aceste cazuri au fost:

- *Enterococcus faecalis* (6 cazuri),
- *Pseudomonas aeruginosa* (5 cazuri),
- *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* (4 cazuri),
- *E. coli* (3 cazuri),
- *Klebsiella oxytoca* spp. (2 cazuri);
- *Beta-hemolitic streptococ*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Citrobacter* spp.,
- *Proteus* spp.

Aceste bacterii, izolate de la reptile, au prezentat diferite grade de rezistență împotriva majorității grupurilor de antibiotice, printre care cel mai adesea la: cefalosporinele din toate generațiile (cefalexină, cefuroximă, cefquinom etc.), macrolide (erythromycin), lincosamide, peniciline (ampicilină, amoxicilină / acid clavulanic), amikacin, gentamicină) florfenicoli, tetraciclină (tetraciclină, doxiciclină) și aminoglicozidelor, rezistența fiind mai rar întâlnită în cazul cloramfenicolilor, sulfamidelor sau quinolonelor (tabelul 4 și fig. 188 teză).

Frecvența apariției rezistenței pe genurile bacteriene izolate este prezentată în figura 188 din teză.

Ca și frecvență, rezistența s-a manifestat:

- **cel mai adesea** la genurile *Pseudomonas aeruginosa*, urmat de *Citrobacter brakii*, *Enterococcus faecalis* și *Stenotrophomas (Xanthomonas) maltophilia*,
- **relativ frecvent** la genurile: *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter lwoffii* și *Salmonella* spp.,
- **mai puțin frecvent** în cazul genurilor: *Clostridium fallax*, *Staphylococcus aureus* (rezistență absentă), *Proteus mirabilis*, *Delftia acidovorans* și *Morganella morganii* spp. *morganii*.

În **Tabelul 5** este prezentat un ghid de dozaj al farmaconilor în afecțiunile reptilelor, rezultatul experiențelor proprii ale autorului și al unei sinteze riguroase.

În cadrul **Capitolului 4, Veninul: Structură și potențial mijloc în medicină** este descris un studiu de proteomică dedicat *studiului stucturii biochimice la 12 tipuri diferite de venin de șarpe*

Motivația studiului

Datorită structurii lor multiforme în bio-compuși (ex. peptide, toxine, enzime, până la 100 de proteine și isoformi diferiți) veninul de șarpe este rezultatul imuabil al etapelor evoluției pentru molecule cu structură tot mai complexe cu specificitate ridicată mai ales asupra țintelor naturale ale șerpilor. Această mare abundență în aminoacizi în formarea proteinelor, în general posedând caracteristici enzimactice și polipeptidice specifice sunt adesea diferite de la o specie de șarpe la alta, dar autorii sunt de acord că aceste ansambluri pot fi clasificate în mai multe familii chimice comune: *fosfodiesteraze*, *acetilcolinesteraze*, *fosfolipaze*, *proteaze (serine și metallo)*, *disintegrine*, precum și așa numitele “*three-finger toxins*” *tri-toxinele: neuro-cardio-hemo-miotoxinele*.

Fără îndoială, amestecul acesta mare de molecule cu activități biochimice prezent în veninurile de șarpe face aceste structuri variate și complexe atractive pentru investigarea unor noi resurse terapeutice.

Componentele din venin sunt recunoscute ca eficiente în tratamentul patologiei sângelui, în principal în hemostază și în procesele de anticoagulare / coagulare, hipertensiune influențând inhibitorii enzimei de conversie a angiotensinei sau în afectul renal. De asemenea desintegrinele din venin s-au dovedit a fi modulatori ai integrinelor, cu activitate certă anti-tumorală, metastatice sau ca agenți anti-angiogenici, aceste noi surse fiind studiate și pentru posibile tratamente ale artritei și trombozei.

Obiective

Prezentul studiu propune o examinare preliminară de proteomică, printr-o metodologie utilă, repicabilă a compoziției veninului provenit de la 12 specii de șerpi (din genurile *Elapidae* și *Viperidae*, inclusiv *Crotalinae*).

Locul de desfășurare al analizei

Uscarea prin congelare a probelor de venin precum și identificarea fracțiunilor proteice din venin a fost efectuată în cadrul laboratoarelor de studiul antioxidanților și biologie molecular (A2) și Farmacologie –

toxicologie (B12) din cadrul CLC-HC (Complexul de Laboratoare de Cercetare H. Cernescu) USAMVBT, analiza analitică a probelor fiind realizată și certificată de către Conf. dr. Camelia Tulcan (FMV Timișoara).

Analiza cromatografică

A fost realizată cu ajutorul unui *spectrofotometru, Perkin Elmer Lambda 25*.

Metoda de validare

S-a realizat prin determinarea substanței solide conform metodei standardizate cunoscute în domeniu la 103°C. Randamentul de uscare prin congelare a fost calculat ca procent din materia uscată obținută prin comparație cu cantitatea inițială conținută în ea. Probele au fost liofilizate și depozitate la congelator la -20°C în tuburi Eppendorf fiind sigilate cu folie de parafină pentru a se preveni umezirea probelor.

Electroforeza Capilară în Gel (CGE) pe cip cu detecție prin fluorescență indusă cu laser.

Metoda CGE pe cip. S-a realizat prin utilizarea unui bioanalizor model *Agilent 2100 (Agilent Technologies, Germany)* (fig. 190 teză) cu kiturile: *Protein 80-LabChip* și *Protein 230-LabChip*, în conformitate cu protocolul de lucru descris de producătorul echipamentului și după metodologia descrisă de Halassy și col., (2017).

Interpretarea electroforegramelor

S-a fost realizat utilizând software-ul de testare *Protein 2100 expert (Agilent)* furnizat de către producător, în ceea ce privește detectarea vârfului, cantitatea și calitatea fracțiunilor proteice detectate după cum urmează:

- a). *Proteina 80* (scală) dimensiune vârf: 1.60, 3.5, 6.50, 15.00, 28.00, 46.00, 63.00, 95.00 kDa;
- b). *Proteina 230* (scală) dimensiune vârf: 4.50, 7.00, 15.00, 28.00, 46.00, 63.00, 95.00, 150.00, 240.00 kDa.

Recoltarea veninului

În toate cazurile, manipulările de animale, inclusiv recoltarea de venin de la șerpi au fost în conformitate cu protocoalele aprobate de UNC IACUC. Probele de venin au fost recoltate de doctorand (ca persoană certificată în colectarea veninului) după tehnica de recoltare clasică cunoscută în literatură. Au fost obținute probe de venin proaspăt de la 12 specii diferite de șerpi.

În Tabelul 6 din teză sunt prezentate speciile de șerpi de la care s-au recoltat probe de venin. După prelevarea probelor, veninul a fost uscat la aer și probele depozitate, în stare cristalizată, la congelator, la -22± 2°C până la efectuarea analizei chimice.

Tabelul 6 (teză).

Speciile de șerpi de la care s-au recoltat probe de venin

Nr. crt.	Specia	Abrevierea
1.	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	AB
2.	<i>Crotalus horridus horridus</i>	CHH
3.	<i>Crotalus molossus nigrescens</i>	CMN
4.	<i>Crotalus ravus ravus</i>	CRR
5.	<i>Crotalus scutulatus salvini</i>	CSS
6.	<i>Crotalus simus tzabcan</i>	CST
7.	<i>Crotalus vegrandis</i>	CV
8.	<i>Vipera ammodytes transcaucasina</i>	VAT
9.	<i>Vipera aspis</i>	VA
10.	<i>Vipera bitis arietans</i>	VBA
11.	<i>Vipera bitis nasicornis</i>	VBN
12.	<i>Vipera xantina palestinae</i>	VXP

Determinarea conținutului în proteină

Conținutul total de proteină al mostrelor a fost determinat în conformitate cu metodologia clasică cunoscută, furnizată inițial de către Lowry care a fost adaptată pentru venin, de către Dutta și col. (2017), curba de calibrare fiind preparată cu BSA. Rezultatele au fost prezentate ca procent (%) din conținutul de proteine din masa totală a veninului ca medie ±SD a trei probe (figura 191 teză). Valorile electroforegramelor realizate pe probele de venin liofilizate sunt prezentate în Tabelul 7 din teză.

Discuții

Abordarea noastră poate fi clasificată în grupul tot mai numeros al proiecțiilor inițiale pentru identificarea potențialelor mijloace farmacoterapeutice inovatoare oferite de către componentele existente în veninul de șarpe. Obiectivul principal a fost de a identifica cu certitudine noi structuri /fracțiuni cu posibile caracteristici favorabile pentru sănătate. Cea mai mică moleculă, ca masă moleculară, determinată de noi a fost observată în intervalul **6-7 kDa** și este legată de prezența *myotoxinelor non-PLA2 (Phospholipase A2 myotoxins)*, cele care joacă rolul de reducere a cursei după pradă post-venenomație (după mușcătura letală). În cazul nostru am constatat că: *Crotalus*

vegrandis (CV) posedă veninul care conține cel mai mare procent din proba analizată, urme ale acestei micotoxine fiind detectate, de asemenea, în cazul *Viperei bitis arietans* (VBA) și a *Viperei xantina palestinae* (VXP).

Disintegrine de dimensiuni scurte și medii au fost identificate în intervalul **7-10 kDa**. Aceste molecule sunt derivate din *metaloproteazele* din veninul de șarpe (SVMPs), care sunt înrudite filogenetic cu familiile:

- **protein ADAM** (*a disintegrin and metalloproteinase*) și
- **ADAMTS** (*a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif*), alt grup de dezintegrine și metaloproteaze prezente în venin. Aceste proteine au capacitatea de a interacționa specific cu integrinele, activitatea lor de inhibare conducând la descoperirea potențialului lor în diagnosticul terapiei cancerului.

Bitistatina și *crotoxina* acționează ca și dezintegrine pentru integrinele de tip: α IIb; β 5 și respectiv *av*, cu liganzi ca: *fibrinogenul*, *fibronectina*, *vitronectina* și *colagenul*, cu rol cunoscut în angieneză, în procesele specifice de migrație și invazie [57].

Fosfolipaza A, identificată de noi, cu un interval de masă moleculară de **12-17 kDa** este o enzimă Ca^{2+} dependent, care hidrolizează gruparea *2-acil* de la *3-sn-fosfogliceride* cu efecte farmacologice semnificative, cum ar fi: *mionecroza*, *deteriorarea membranei lipidice*, *neurotoxicitate*, *cardiotoxicitate*, *inițierea / inhibarea agregării plachetare*, *neurotoxicitate post / pre-sinaptică*.

Noi am identificat subgrupul *fosfolipaza PLA2 grup II-A* în veninurile provenite de la șarpele cu clopoței și de la vipere. Alcătuirea acestor subgrupe este determinată de poziția celui de al 49-lea aminoacid, cunoscut cu un rol crucial în cataliză. În ciuda faptului că această enzimă exista mai ales sub forma sa de monomer, variația masei moleculare poate proveni din agregare sau complexare ca urmare a interacțiunilor covalente sau non-covalente dintre PLA2 și alte proteine. Efectul asocierii proteinelor suplimentare este decisiv în amplificarea efectului farmacologic al acestora. Este și cazul particular al *crotoxinei* și a numeroaselor alte neurotoxine de tip crotoxină, de exemplu, toxinele din veninul de *Crotalus scutulatus salvini* (CSS) (sau toxina Mojave) sau *Crotalus vegrandis* (CV) (sau vegrandis-toxin) care poate explica apariția fracțiunilor de **15-17 kDa** pentru aceste specii (în proporție de 27,3 și respectiv 58,3%). Toxinele Viperidelor conțin un reprezentant al grupului *PLA2 heterodimeric* care se încadrează cu intervalul masei moleculare între **13-14kDa** cu o apariție de 15,4% (pentru *Vipera xantina palestinae*) fapt descris și de către alți autori. În intervalul de **21-24 kDa**, *Crotalus molossus nigrescens* (CMN) a înregistrat cea mai mare concentrație de proteinază E (67,5%), fracțiune separată și descrisă prima dată de către Ramirez și col. (1990), ca pe o proteină cu greutatea moleculară de 21.390 și conținând următoarea secvență N-terminală de aminoacizi: *Phe-Ala-Lys-Arg-Tyr-Val-Glx-Leu-Val-Ile-Val-Ala*.

Metaloproteazele hemoragice din veninul de șarpe (SVMPs) sunt toxinele cele mai abundente din veninurile viperidelor și au evoluat din membrii familiei ADAM. (cel mai probabil, din cadrul încrângăturilor ADAM 7, o *like-metaloprotează non-catalitică* și ADAM 28, o *metaloprotează proteolitică* cu activitate asupra matricei extracelulare). Acestea sunt considerate proteine multi-domeniu și sunt structurate în sub-clase descrise de către autori ca fiind:

- *P-I* (**25-30 kDa**) cu acțiune hemoragică și / sau non-hemoragică,
- *P-II-a* (**30-45 kDa**) cu acțiune hemoragică
- *P-II-b* (**30-45 kDa**) de inhibarea agregării plachetare
- *P-III* (**50-100 kDa**) cu acțiune hemoragică, apoptotică și de activare a factorului X.

Valorile procentuale obținute pe kitul Protein 80-LabChip din venin cristalizat (C) și cel uscat prin îngheț freeze dried (FD) este relevantă în **Tabelul 8 din teză**, iar o sinteză a sub-claselor identificate de noi și activitatea lor specifică / autori citați este prezentată în **Tabelul 9 din teză**.

În *subclasa PI*, au fost observat, (doar în cazul PI SVMPs), că doza minimă hemoragică este mai mare decât cea descrisă pentru subclasa P-III. Metaloproteaza PII c, billitoxina I a fost izolată și caracterizată din veninul de *Agkistrodon bilineatus* (AB). Aceasta nu a avut nici o activitate de agregare plachetară și a fost determinată într-o proporție de 8% la AB (**intervalul 30-40 kDa**).

În cazul nostru, nivelurile cele mai ridicate de **Zn metaloprotează PIII** le-am identificat în veninul de:

- *Agkistrodon bilineatus* (AB),
- *Crotalus horridus horridus* (CHH),
- *Vipera aspis* (VA),
- *Vipera xantina palestinae* VXP, cel înalt nivel (50,4%) fiind găsit în veninul de:
- *Crotalus simus tzbacan* (CST).

În gama de **60kDa** componenta majoră (37,1%) a fost identificată de noi în veninul de *Vipera xantina palestinae* (VXP) și într-o măsură ceva mai mică la *Vipera aspis* (VA) și ar putea fi legată de **trei factori haemoragici** cu activitate proteolitică intensă, având ca substrat cazeina și gelatina, care au fost deja descrise în literatură.

În veninul de *Agkistrodon bilineatus* (AB) analizat am identificat cea mai mare fracție de **70-80 kDa**, ca fiind hialuronidază (29,6%). În ciuda demonstrării apariției tuturor componentelor majore ale veninului de șarpe în domeniul Proteină 80-labChip, noi am efectuat în paralel și electroforegrame pentru domeniul Proteină 230-labChip. Acestea dezvăluie, doar pentru *Vipera aspis* (VA) o greutate moleculară de **125 kDa**, care a fost descrisă ca fiind o proteină pro-coagulantă

Din concluziile fiecărui capitol au reieșit cinci **Concluzii generale**:

1. Cea mai întâlnită entitate morbidă la reptile este cea de natură digestivă (medicală / parazită) fiind urmată în ordine de cea: dermatologică; respiratorie; a SNC, organelor de simț; reproductivă; aparatului osteo-muscular (de natură medicală/traumatică); aparatului urinar; tumori și intoxicații.
2. Distribuția comparativă a bolilor / nr. caruri / specia de reptilă / tipuri de boală a relevat valori semnificative statistic și înalt semnificative statistic pentru chelonieni / șerpi veninoși și neveninoși (**p <0.001) și șopârle / șerpi veninoși / neveninoși (*p <0.01 și respectiv *** p<0.001)
3. Comparativ speciile de reptile cele mai sensibile la îmbolnăvire sunt în ordine: broaștele țestoase; șerpii veninoși; șerpii neveninoși și respectiv șopârlele
4. Tratamentul antibiotic la reptile este dificil și periculos fără o antibiogramă. La reptile fenomenul rezistenței la antiinfecțioasele utilizate în tratamentele curente poate fi considerat frecvent întâlnit. Practic fiecare antibiotic din studiul nostru a dezvoltat rezistență; de la quinolone, în două cazuri a două tulpini, până la macrolide (la 19 tulpini din totalul de 22 identificate). Aceste bacterii, izolate de la reptile, au prezentat diferite grade de rezistență împotriva majorității grupurilor de antibiotice, printre care: peniciline (ampicilină, amoxicilină / acid clavulanic), cefalosporine (cefalexină, cefuroximă, cefquinom etc.), macrolide (erythromycin), lincosamide amikacin, gentamicină), tetraciclină (tetraciclină, doxiciclină).
5. Cea mai mică moleculă, ca masă moleculară, determinată de noi a fost observată în intervalul **6-7 kDa** și este legată de prezența **myotoxinelor non-PLA2 (Phospholipase A2 myotoxins)** Noi am identificat subgrupul **fosfolipaza PLA2 grup II-A** în veninurile provenite de la șarpele cu clopoței și de la vipere

Teza a generat următoarele **aspecte originale / noutate**:

1. Prezentul studiu, după cunoștința noastră este prima cercetare complexă dedicată analizei profilului patologic al patru genuri de reptile aducând date noi, valoroase utilizabile de către specialiștii domeniului
2. În ciuda demonstrării apariției tuturor componentelor majore ale veninului de șarpe în domeniul Proteină 80-labChip, noi am efectuat în paralel și electroforegrame pentru domeniul Proteină 230-labChip.
3. Acestea dezvăluie, doar pentru *Vipera aspis* (VA) o greutate moleculară de **125 kDa**, care a fost descrisă ca fiind o proteină pro-coagulantă, descrisă ca fiind implicată în reducerea timpului clotting de plasmă, fără nicio activitate directă în procesul de coagulare la fibrinogenului
4. Descoperirea unor toxine cu masa moleculară mai mare de 80 kDa, în cazul veninurilor provenite de la *Vipera aspis* și *Vipera xantina Palestinae* probe examinate pe cipul de electroforegramă Protein 230-LabChip kit, poate fi considerat un aspect de noutate.

Summary of PhD Thesis titled:

A pharmaco-therapeutic perspective in high-incidence diseases in reptiles and snake venom: structure and potential in medicine

This thesis contains:

<i>List of abbreviations</i>	
<i>Abstracts in: Romanian and English</i>	
<i>Bibliographic research:</i>	26 pages
<i>Own researches:</i>	123 pages
<i>Tables:</i>	9
<i>Figures:</i>	191
<i>Bibliographic sources:</i>	152

Domains of study:	<i>veterinary medicine, biology, zoology</i>
Subdomains:	<i>pharmacology, therapy, medical diseases, toxicology, herpetology</i>
Keywords:	<i>reptiles, pathology, pharmaco-therapeutic venoms, proteomics.</i>

Motivation of choosing the research theme

The theme of the thesis is situated on the border between several fields: biology - zoology - veterinary medicine, and is of significant interest for the subdomain of herpetology and medicine of these fascinating animals, a topic as interesting as not (yet) known in Romania.

For this reason, the proposed research theme can be considered appropriate with an important added potential of knowledge for veterinary sciences.

From our knowledge, except for human resources training courses, a comprehensive PhD research, strictly on this topic of reptile medicine, has not been published in our country (or if different materials appeared on this topic, they are incomplete, old, or contain outdated data) and hence the need for a doctoral research.

The importance and the actuality of the subject

The fascination that reptiles bring to people, makes more and more, especially, young people to become extremely passionate about this kind of animals.

Today, this can be easily noticed, the unprecedented development of reptile concerns: exhibitions, dedicated pet shops, theme parks, TV shows, thematic courses and presentations, etc. being in great vogue today, highlighting the actuality of this doctoral subject.

In this respect, in Europe, "the great interest" for this topic has a million euro / year business behind it, and as a result of the increase in the number of terrariums, the need for knowledge is growing more and more in addition to the maintenance and feeding of these animals, veterinary practitioners, and information about, handling, pathology, therapeutic techniques or specific medication to be administered to reptilians are increasingly sought by owners. So, knowing the classical and modern methodologies of investigating the main morbid entities and the means of effective therapeutic intervention on reptiles is a field where there are still large areas of lack of knowledge. For this reason the present topic may be of interest.

According to the instructions in force, the thesis is composed of two large parts:

- *The general part - The current state of knowledge* and
- *Own research*

General part

Current state of knowledge

It is expanded on *26 pages* and structured in two chapters, respectively:

Chapter 1 where short remembrances are made about phylogeny, the classification of the main reptilian orders.

Reptilians are ranked in four large orders: *Testudines* (Chelonians), *Sphenodontia* (Tuatara), *Squamata* (Crocodiles, Alligators and Gavials), their main characteristics are being described punctually.

Chapter 2 is dedicated to techniques of manipulating, fixing and harvesting snakes' venom, with descriptions of: Taxonomic classification of venomous snakes, types of serpentine teeth, manipulation of venomous snakes in the veterinary clinic, equipment and handling techniques

Also described are the venom extraction methodology, venom manipulation and storage, but also important elements about snake venom (main components of venom, snake venom effects, LD50 venom dose and some venom applications in medicine.

Own researches

This part extends to 123 pages and is composed of:

Chapter 3.

Contributions to the pharmaco-therapeutic approach to reptile diseases

with two subchapters:

A. *The pharmaco-therapeutic study of the main morbid entities in reptiles and*

B. *Study of bacterial load and effectiveness of anti-infectious therapy in reptiles*

Place of study

Studies A and B were conducted in the clinics of Dr. Nagy and Dr. Kocsis of Bärenbronn, Wüstenrot Germany between **01.08.2013 - 26.09.2017** on a total of **389** cases, respectively:

Study A.

- *166 tortoises and turtles;*
- *98 snakes (venomous / nonvenomous: 39/59) and*
- *125 lizards.*

Table 1 of the thesis presents the general situation / categories of specific diseases treated / species studied.

Study B.

Of the total of 389 cases of reptiles examined in the study, to monitor the effectiveness of the treatments and to identify possible forms of resistance to the antiinfectives used, 25 cases / reptile species were identified from those with long-term and no clinical improvement as it follows:

- two species of turtles,
- eight species of lizards and
- fifteen species of snakes.

Samples were collected from:

- *oral cavity,*
- *respiratory tract,*
- *skin wounds,*
- *abscesses and*
- *feces.*

Methodology

Study A. The means of investigation and treatment in this thesis were the classic ones, namely the clinical, laboratory and imaging investigations, for the treatments the principles of allopathy being applied.

Study B. The method used to determine the degree of susceptibility of the identified bacterial strains was by antibiogram method using the *MIC = Minimum Inhibitory Concentration* technique, performed within Synlab Vet – Labor from Leverkusen Germany, accredited laboratory.

The purpose of the study was to reveal the most important issues related to:

- description of the specific pathology of reptiles;
- description / inventory of the most effective therapeutics usable by specialists in the morbid entities of these animals;
- identifying the major bacterial / viral genes that have generated medical conditions in reptiles;
- identifying the resistance phenomenon to the antiinfectives used.

In the first study; **A. The pharmaco-therapeutic study of the main morbid entities in reptiles** the most representative cases and treatments on reptile categories are described during the monitoring period.

The following diseases are presented:

a. internal diseases:

- **dermatological diseases in reptiles:** difficulty in shedding (dysecdysis), tortoise beak malformation, necrosis of turtle plastron, viper vesicular disease, hematoma in the metatarsal and subcutaneous region, tail trauma in lizards, bite wounds in turtles, papillomatosis, subcutaneous emphysema, dermatitis and paniculitis, abscesses, etc. in lizards;
- **diseases associated with sensory organs:** hypovitaminosis A turtle, unilateral and bilateral conjunctivitis in turtles and lizards, post-hibernal keratoconjunctivitis in turtle, post-hibernal ocular atrophy, intraorbital inflammation in *Bitis gabonica*, bilateral purulent otitis media and ocular trauma in *Trachemys scripta elegans* etc.;
- **diseases associated with the digestive system:** oral accumulation in bearded dragon, stomatitis and sinusitis in water dragon, bacterial stomatitis in bearded dragons and turtles, dental tartar in bearded dragon, purulent stomatitis and abscess in the rostral region of *Boa constrictor*, anorexia in leopard gecko and *Boa constrictor*, hepatic steatosis and bile cysts in bearded dragons, gastric dilatation of unknown nature in snakes, subcapsular hepatic hemorrhage in bearded dragons, foreign bodies in stomach in turtle, megadolocolon in bearded dragons, intestinal obstruction with wood shavings in chameleon, ileus in iguanas.
- **virosis, bacteriosis and parasitosis:** paramyxovirosis in *Boa constrictor*, *Bitis nasicornis* and *Bitis arietans*, purulent esophageal infection in *Corallus caninus*, constipation of parasitic origin in lizards, post-hibernal intestinal obstruction with *Oxyuris* in turtle, intestinal obstruction with ascarids, parasites most commonly encountered in reptiles, pentastomosis, bacterial and micotic enteritis in lizards, chromomycosis an capillariasis, pulmonary candidiasis in vipers, acariosis in bearded agamas.
- **diseases associated with the respiratory and cardiovascular system:** tracheitis, pneumonia and necrotic-purulent pneumonia in snakes and lizards
- **diseases associated with the urinary system:** articular gout, visceral gout in chameleons and snakes, renal insufficiency and urinary retention in turtles
- **diseases associated with the reproductive apparatus:** dystocia (postovulatory) in lizards, turtles and snakes, follicular stasis and calcification in snakes and, preovulatory dystocia in agama, penile prolapse in turtles, hemipenian prolapse in snakes and bearded dragons, oviduct prolapse in turtles and cloacal prolapse in agama, inflammation and cloacal ulceration in turtles
- **diseases associated with the bone and muscular system:** tibio-fibular and thoracic fracture in lizards, osteodystrophy in bearded dragons and iguanas, osteomalacia in chameleons, gangrene and muscle necrosis

b. tumors

- melanoma and spinocellular melanocytomas in agamas,
- neoplastic oral formations and fibroepithelial polyp of the oral cavity in agamas
- multiple tumors: spinocellular carcinoma, skin tumors in snakes
- malignant neoplasms of mesenchymal origin of fusiform cells in agamas

c. surgical

- cloacal prolapse of snakes and lizards,
- enterectomy in snakes,
- amputation of limb in lizard and turtle

d. intoxications

- intoxication with permethrin in agama.

After presenting the main pathological entities and the expected treatment regimes, in subchapter 3.3.5. a statistical analysis of the data from the pharmaco-therapeutic study was performed. Figures 183-187 of the thesis present the results of the statistical analysis by types of diseases and reptile species and the statistical correlations carried out using the *ANOVA* program, according to *Tukey's Multiple Comparison Test*, which we considered the most appropriate for analyzing this type of results. *Bonferroni's Multiple Comparison Test* was used to adjust the reptilian interpolation probabilities. This correction adjusts probabilities (p) because of the increased risk of type I error in performing multiple statistical tests. Thus, of the 389 cases studied, nine major morbid entities were identified. By trying a top five of the morbid entities that affect all reptile species, the author has identified the following diseases:

- [10] digestive
- [11] dermatological
- [12] respiratory
- [13] CNS and sensory organs
- [14] reproductive

These were accompanied by four others, but in a much smaller proportion:

- [15] of the osteo-muscular apparatus (systemic / traumatic nature)
- [16] of the urinary system
- [17] tumors
- [18] intoxications

The results of the analysis revealed significant statistical correlations in the order of the incidence of diseases / reptile species, compared to all species and diseases identified, digestive diseases / other illnesses being studied are clearly important from a practical point of view (** $p < 0.01$) (Fig. 183 thesis).

The comparison of the incidence of digestive diseases with the other diseases diagnosed in the study revealed statistically significant values (media \pm SEM) (***) ($p < 0.001$) (Fig. 184 thesis).

Comparative distribution of diseases / no. of cases / reptile species / types of disease also revealed statistically significant and highly significant statistically values (Fig.185) for the following situations:

- *chelonians / venomous and nonvenomous snakes* (***) ($p < 0.001$);
- *lizards / venomous snakes / nonvenomous snakes* (** $p < 0.01$, respectively (***) ($p < 0.001$))

By analyzing the link between the reptile species and the main two diseases (digestive and dermatological) that occurred in the studied case, we noticed that the incidence of digestive diseases (the most common) and skin diseases (the second most common) (Fig. 186 thesis) was comparatively increased in this species:

- *chelonians / snakes* (** $p < 0.01$);
- *lizards / snakes* ### $p < 0.01$;
- *lizards / chelonians and snakes* (** $p < 0.01$)

The comparative correlations between reptile species / disease type for chelonians / snakes / lizards are statistically highly significant (***) ($p < 0.001$) (Figure 187), which in this case justifies the appreciation that the most sensitive reptile species are in the following order:

- *tortoises/turtles*
- *venomous snakes*
- *nonvenomous snakes*
- *lizards*

The second study of this chapter followed the ***B. Study of bacterial load and effectiveness of anti-infectious therapy in reptiles***

Reptiles can often be reservoirs for a wide variety of bacteria that are often passed on to other pets and even to humans. The phenomenon of antimicrobial resistance is also present in reptiles, the general trend of this phenomenon being constantly increasing. A motivation could also be the lack of knowledge of the most appropriate remedies (groups) of anti-infective pharmacons / clinical entity, which determines the use of the same type of antibiotic for long periods of time, analyzing the antibiogram as the current method of detecting the best anti-infective remedy, at least in our country, at the beginning.

A total of 43 samples were processed on culture media for aerobic or anaerobic bacteria. Table 3 presents the results of antibiotics / bacterial species and antibiotics to which the strains were tested for resistance. The most commonly isolated bacteria in these cases were:

- *Enterococcus faecalis* (6 cases),
- *Pseudomonas aeruginosa* (5 cases),
- *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* (4 cases),
- *E. coli* (3 cases),
- *Klebsiella oxytoca* spp. (2 cases);
- *Beta-hemolytic streptococcus*,
- *Staphylococcus aureus*,
- *Citrobacter* spp.,
- *Proteus* spp.

These bacteria, isolated from reptiles, showed varying degrees of resistance against most antibiotic groups, including most often: cephalosporins of all generations (cefalexin, cefuroxime, cefquinome etc.), macrolides (erythromycin), lincosamides, penicillins (ampicillin, amoxicillin / clavulanic acid), florfenicols, tetracycline (tetracycline, doxycycline) and aminoglycosides, the resistance being less common for chloramphenicols, sulfamides or quinolones (table 4 and fig. 188).

The frequency of resistance on isolated bacterial genes is shown in Figure 188 of the thesis.

As frequency, resistance was manifested:

- *most often* in *Pseudomonas aeruginosa*, followed by *Citrobacter brakii*, *Enterococcus faecalis* and *Stenotrophomas (Xanthomonas) maltophilia*,
- *relatively frequently* in: *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter lwoffii* and *Salmonella* spp.,
- *less frequently* in: *Clostridium fallax*, *Staphylococcus aureus* (resistance absence), *Proteus mirabilis*, *Delftia acidovorans* and *Morganella morganii* spp. *morganii*.

In **Table 5** a dosing guide for drugs in reptile diseases is presented, the result of the author's own experiences and a rigorous synthesis.

In **Chapter 4, Venom: Structure and potential means in medicine** a proteomics study is described, dedicated *to the study of the biochemical structure on 12 different types of snake venom*

Motivation of the study

Due to their multiforme structure in bio-compounds (eg, peptides, toxins, enzymes, up to 100 proteins and different isoforms), snake venom is the immutable result of evolutionary stages for molecules with an increasingly complex structure with high specificity especially on natural targets of snakes. This high abundance of amino acids in protein formation, generally possessing specific enzymatic and polypeptide characteristics are often different from one snake species to another, but the authors agree that these assemblies can be classified into several common chemical families: *phosphodiesterases*, *acetylcholinesterases*, *phospholipases*, *proteases* (*serine and metallo*), *disintegrins*, as well as the so-called "*three-finger toxins*" - *the tri-toxins: neuro-cardio-hemomyotoxins*.

Undoubtedly, this large blend of molecules with biochemical activities present in snake venoms makes these diverse and complex structures attractive for investigating new therapeutic resources. Venom components are recognized as effective in the treatment of blood pathology, mainly in haemostasis and in anticoagulation / coagulation processes, hypertension influencing angiotensin converting enzyme inhibitors or in kidney disease. Also, the venom disintegrins have been shown to be integrin modulators, with definite anti-tumor activity, metastatic or anti-angiogenic agents, these new sources being also studied for possible treatments of arthritis and thrombosis.

Objectives

The present study proposes a preliminary proteomic examination, using a useful, replicable methodology of venom composition from 12 species of snakes (of the genus *Elapidae* and *Viperidae*, including *Crotalinae*).

Location of the analysis

The freeze-drying of venom samples as well as the identification of the protein fractions from the venom was performed in the laboratories of the study of antioxidants and molecular biology (A2) and Pharmacology - toxicology (B12) of CLC-HC (Research Laboratory Complex H. Cernescu) USAMVBT, the analytical analysis of the samples being carried out and certified by the Associate Professor Dr. Camelia Tulcan (FVM Timișoara).

Chromatographic analysis

It was done using a *spectrophotometer, Perkin Elmer Lambda 25*.

Validation method

It was done by determining the solid substances according to the standardized method known in the domain at 103° C. The freeze-drying yield was calculated as a percentage of the dry matter obtained by comparison with the initial amount contained in the samples. Samples were lyophilized and stored in the freezer at -20° C in Eppendorf tubes being sealed with paraffin foil to prevent wetting of the samples.

Capillary Gel Electrophoresis (CGE) on chip with laser-induced fluorescence detection.

CGE method on chip. It was done by using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Germany) (Figure 190) with kits: Protein 80-LabChip and Protein 230-LabChip, according to the working protocol described by the manufacturer of the equipment and according to the methodology described by Halassy et al., (2017).

Interpretation of electropherograms

It was done using the test software Protein 2100 expert (Agilent) provided by the manufacturer, in terms of peak detection, the amount and quality of the protein fractions detected as follows:

a). *Protein 80* (scale)

peak size: 1.60, 3.5, 6.50, 15.00, 28.00, 46.00, 63.00, 95.00 kDa;

b). *Protein 230* (scale)

peak size: 4.50, 7.00, 15.00, 28.00, 46.00, 63.00, 95.00, 150.00, 240.00 kDa.

Harvesting the venom

In all cases, animal manipulations, including snakes venom' harvesting, were in line with the UNC IACUC approved protocols. The venom samples were collected by the PhD student (as a certified person in venom collection) according to the classical harvesting technique known in the literature. Fresh venom samples were obtained from 12 different species of snakes. In **Table 6 in the thesis** the species of snakes from which venom samples were harvested are presented. After sampling, the venom was air-dried and the samples stored in a crystalline state in the freezer at $-22 \pm 2^\circ\text{C}$ until the chemical analysis.

Table 6 (thesis).

The species of snakes from which venom samples have been harvested

Crt. no.	Species	Abbreviation
1.	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	AB
2.	<i>Crotalus horridus horridus</i>	CHH
3.	<i>Crotalus molossus nigrescens</i>	CMN
4.	<i>Crotalus ravus ravus</i>	CRR
5.	<i>Crotalus scutulatus salvini</i>	CSS
6.	<i>Crotalus simus tzabcan</i>	CST
7.	<i>Crotalus vegrandis</i>	CV
8.	<i>Vipera ammodytes transcaucasina</i>	VAT
9.	<i>Vipera aspis</i>	VA
10.	<i>Vipera bitis arietans</i>	VBA
11.	<i>Vipera bitis nasicornis</i>	VBN
12.	<i>Vipera xantina palestinae</i>	VXP

Determination of protein content

The total protein content of the samples was determined according to the known classical methodology originally provided by Lowry which was adapted for venom by Dutta et al. (2017), the calibration curve being prepared with BSA. The results were presented as percent (%) of the protein content of the total venom mass as the mean \pm SD of three samples (fig. 191 thesis). The values of electroforegrams made on lyophilized venom samples are presented in **Table 7 in the thesis**.

Discussions

Our approach can be classified into the increasing number of initial projections for identifying potential innovative pharmacotherapeutic means offered by existing components in snake venom. The main objective was to identify with certainty new structures / factions with possible health-friendly features.

The smallest molecule as molecular weight as determined by us was observed in the **6-7 kDa** range and is related to the presence of a *non-PLA2 myotoxin (Phospholipase A2 myotoxins)*, those that play the role of reducing the race after lethal bite. In our case we found that: *Crotalus vegrandis* (CV) possess the venom containing the highest percentage of the analyzed sample, traces of this myotoxin are also detected in the case of *Viperei bitis arietans* (VBA) and *Viperei xantina palestinae* (VXP).

Short and medium disintegrins were identified in the range of **7-10 kDa**. These molecules are derived from snake venom *metalloproteases* (SVMPs), which are phylogenetically related to families:

- **ADAM protein** (a disintegrin and metalloproteinase) and
- **ADAMTS** (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type-1 motif), another group of disintegrins and metalloproteases present in the venom. These proteins have the ability to specifically interact with integrins, their inhibitory activity leading to the discovery of their potential in the diagnosis of cancer therapy.

Bitistatin and *crotafroxin* act as disintegrins for type: α IIb; β 5 and α v integrins, with ligands like: *fibrinogen*, *fibronectin*, *vitronectin* and *collagen*, with a role known in angiogenesis, in the specific processes of migration and invasion [57].

Phospholipase A, identified by us, with a molecular weight range of **12-17 kDa** is a Ca²⁺ dependent enzyme, which hydrolyzes 2-acyl grouping from 3-sn- *phosphoglycerides* with significant pharmacological effects such as: *mionecrosis*, *lipid membrane damage*, *neurotoxicity*, *cardiotoxicity*, *initiation / inhibition of platelet aggregation*, *post / presynaptic neurotoxicity*.

We identified *Phospholipase PLA2 group II-A* in the venom from rattlesnake and vipers. The composition of these subgroups is determined by the position of the 49th amino acid, known as a crucial role in catalysis. Despite the fact that this enzyme is predominantly in its monomeric form, variation in molecular mass may result from aggregation or complexation due to covalent or non-covalent interactions between PLA2 and other proteins. The effect of associating additional proteins is decisive in amplifying their pharmacological effect. This is also the case with *crotoxin* and many other crotoxin type neurotoxins, for example, toxins from the venom of *Crotalus scutulatus salvini* (CSS) (or Mojave toxin) or *Crotalus vegrandis* (CV) (or vegrandis-toxin) which can explain the appearance of fractions of **15-17 kDa** for these species (in the proportion of 27.3 and 58.3% respectively).

Viperide toxins contain a representative from *PLA2 heterodimeric* group which falls within the range of molecular weight between **13-14kDa** with an appearance of 15.4% (for *Vipera xantina palestinae*) as described by other authors also. In the range of **21-24 kDa**, *Crotalus molossus nigrescens* (CMN) recorded the highest proteinase E concentration (67,5%), a separate fraction, first described by Ramirez et al. (1990), as a proteinase with a molecular weight of 21,390 and containing the following N-terminal amino acid sequence: *Phe-Ala-Lys-Arg-Tyr-Val-Glx-Leu-Val-Ile-Val-Ala*.

Haemorrhagic metalloproteases from snake venom (SVMPs) are the most abundant toxins in the viper's venom and have evolved from the members of the ADAM family, (most likely within ADAM 7, a non-catalytic metalloprotease-like and ADAM 28, a proteolytic metalloprotease with activity on extracellular matrix). These are considered multi-domain proteins and are structured in sub-classes described by the authors as being:

- *P-I* (**25-30 kDa**) with hemorrhagic and / or non-haemorrhagic action,
- *P-IIa* (**30-45 kDa**) with hemorrhagic action
- *P-IIb* (**30-45 kDa**) inhibiting platelet aggregation
- *P-III* (**50-100 kDa**) with hemorrhagic, apoptotic and factor X activation.

The percentage values obtained on the Protein 80-LabChip kit from crystallized (C) and from freeze dried (FD) venom is outlined in **Table 8 in the thesis**, and a synthesis of the subclasses identified by us and their specific activity / cited authors is presented in **Table 9 in the thesis**.

In *subclass PI*, were observed, (PI SVMPs only), that the haemorrhagic minimal dose is greater than that described for subclass P-III. Metalloproteinase PIIIc, billitoxin 1 was isolated and characterized from *Agkistrodon bilineatus* (AB). It did not have any platelet aggregation activity and was determined at 8% in AB (**30-40 kDa range**). In our case, the highest levels of **Zn metalloproteinase PIII** was identified in the venom of:

- *Agkistrodon bilineatus* (AB),
- *Crotalus horridus horridus* (CHH),
- *Vipera aspis* (VA),
- *Vipera xantina palestinae* VXP, the highest level (50.4%) being found in the venom of:
- *Crotalus simus tzbacan* (CST).

The range of **60kDa** major component (37,1%) was identified by us in the venom of *Vipera xantina palestinae* (VXP) and to a somewhat smaller extent at *Vipera aspis* (VA) and could be *related to three haemorrhagic factors* with intense proteolytic activity, having as substrate casein and gelatin, which have already been described in the literature.

In the venom of *Agkistrodon bilineatus* (AB) we have identified the largest fraction of **70-80 kDa**, as hyaluronidase (29,6%).

Despite demonstrating the appearance of all major snake venom components in the Protein 80-LabChip domain, we also performed parallel electrophoregrams for the Protein 230-LabChip domain. This discloses only for *Vipera aspis* (VA) a 125 kDa molecular weight that has been described as a pro-coagulant protein.

From the conclusions of each chapter emerged five **General Conclusions**:

6. The most common morbid entity in reptiles is that of digestive (medical / parasitic) nature, being followed in order by: dermatological; respiratory; CNS, the sense organs; reproductive health; osteo-muscular apparatus (of medical / traumatic nature); urinary system; tumors and intoxications.
7. Comparative distribution of diseases / no. of cases / reptile species / types of disease also revealed statistically significant and highly significant statistically values for the following situations: chelonians / venomous and nonvenomous snakes (**p <0.001) and lizards / venomous snakes / nonvenomous snakes (**p <0.01, *** p<0.001 respectively)
8. By comparison, reptile species most susceptible to illness are in order: turtles/tortoises; venomous snakes; non-venomous snakes and lizards
9. Treatment with antibiotics in reptiles is difficult and dangerous without antibiograms. In the reptile, the phenomenon of resistance to anti-infectives used in current treatments can be considered frequently encountered. Practically every antibiotic in our study has developed resistance; from quinolones, in the case of two strains, to macrolides (in 19 strains out of a total of 22 identified). These bacteria, isolated from reptiles, exhibited varying degrees of resistance against most antibiotic groups, including penicillins (ampicillin, amoxicillin / clavulanic acid), cephalosporins (cefalexin, cefuroxime, cefquinome etc.), macrolides (erythromycin) amikacin, gentamicin, tetracycline (tetracycline, doxycycline).
10. The lowest molecular weight molecule we determined was observed in the **6-7 kDa** range and is related to the presence of **non-PLA2 myotoxins (Phospholipase A2 myotoxins)**. We have identified the subgroup **PLA2 group II-A phospholipase** in venomes from rattlesnakes and vipers

The thesis has generated the following **original / novel aspects**:

5. The present study, according to our knowledge, is the first complex research dedicated to analyzing the pathology profile of four genres of reptiles, bringing new, valuable data usable by field specialists
6. Despite demonstrating the appearance of all major snake venom components in the Protein 80-LabChip domain, we also performed parallel electrophoregrams for the Protein 230-LabChip domain.
7. They only reveal for *Vipera aspis* (VA) a **125 kDa** molecular weight that has been identified as a procoagulant protein described as involved in the reduction of plasma clotting time without any direct activity in the fibrinogen coagulation process
8. The discovery of toxins with a molecular weight greater than 80 kDa, in the case of *Vipera aspis* and *Vipera xantina Palestinae* venom samples examined on the Protein 230-LabChip kit electropherogram may be considered a novelty.