

УДК 577.1:615.919
©Коллектив авторов

ФИБРИНОГЕН/ФИБРИН-СПЕЦИФИЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЯДОВ КОБРЫ (*Naja oxiana Eichwald*) И ЩИТОМОРДНИКА (*Agkistrodon halys halys*)

Э.С. Юнусова, Э.С. Садыков, Н.М. Султаналиева, А.В. Шкинев*

Институт биоорганической химии имени академика А.С. Садыкова АН РУз, Республика Узбекистан
100125 Ташкент, ул. М. Улугбека, 83; тел.: +998712623540; эл. почта: gexa83@yandex.ru

Исследована способность фракций ядов кобры (*Naja oxiana Eichwald*) и щитомордника (*Agkistrodon halys halys*) гидролизовать фибриноген/фибрин. В яде кобры компонент с молекулярной массой около 60 кДа гидролизует α -цепь фибриногена, но не расщепляет казеин/азоказеин и фибрин. По чувствительности к ингибированию ЭДТА он проявляет свойства фибриноген-специфичной металлопротеиназы. Яд кобры незначительно уменьшал массу свежих тромбов, сформированных из донорской крови. Яд щитомордника и фракции, полученные при гелефильтрации (на геле Toyopearl HW-50) и ионообменной хроматографии (DEAE-650), гидролизуют казеин/азоказеин, α - и β -цепи фибриногена/фибрина и тромбы из донорской крови. Результаты исследования яда и протеолитически активных фракций свидетельствуют о наличии тромболитического потенциала у компонентов яда щитомордника.

Ключевые слова: яды змей, фракционирование, протеиназы, фибрин(оген)азы, тромболитическая активность

DOI 10.18097/PBMC20166203259

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы при лечении тромбозов и тромбоэмболий широко применяются фибринолитические препараты (стрептолиаза, стрептодеказа, активаторы пламиногена тканевого и урокиназного типов). Стрептолиаза (стрептокиназа, фермент из β -гемолитического стрептококка группы С), её иммобилизованная на полисахаридной матрице форма (стрептодеказа), а также активаторы пламиногена, действуют на пламиноген – компонент противосвертывающей системы организма. Наличие у этих препаратов собственных побочных эффектов, а также определенные ограничения, накладываемые физиологической ролью пламина в организме, обуславливают поиск альтернативных средств лечения тромбозов с повышенной специфичностью, а также минимальным и предсказуемым побочным действием [1]. Такими тромболитическими агентами могут являться фибрин(оген)олитические ферменты змеиных ядов, специфично гидролизующие фибриноген/фибрин, не сворачивающие фибриноген плазмы и не вызывающие геморагии [2-4].

За истекшие 50 лет из ядов змей, преимущественно сем. *Viperidae* и *Crotalidae*, выделен и охарактеризован ряд металлопротеиназ (МП) [5]. Эти, в основном, Zn-содержащие и Ca-зависимые ферменты проявляют фибриногенолитическую, фибринолитическую, протромбиновую и апоптозную активности, активируют фактор X и ингибируют агрегацию тромбоцитов. Классификация этих ферментов основывается на доменной организации [6]; образующие класс P-I энзимы, состоящие из про-домена и домена МП, часто либо лишены, либо демонстрируют незначительную геморагическую активность. Благодаря наличию фибрин(оген)олитической активности эти ферменты, расщепляя богатые фибрином сгустки, восстанавливают

кровоток, а гидролизуют фибриноген, препятствуют их дальнейшему образованию, что в совокупности свидетельствует о потенциальных возможностях фибрин(оген)олитических ферментов как клинических агентов для лечения окклюзирующих тромбов [4]. Из яда *Agkistrodon c. contortrix* выделена фибролаза – фибринолитическая МП (класс P-I), рекомбинантная форма которой – алфимепраз – проходит клинические испытания [4, 7].

Целью настоящей работы была частичная очистка из ядов змей Центральной Азии щитомордника и кобры протеиназ, способных гидролизовать фибриноген/фибрин, и их функциональная характеристика.

МЕТОДИКА

Гельхроматографию яда щитомордника проводили на TSK геле HW-50 ("Toyopearl", Япония; колонка 2,5×80 см), уравновешенном 0,1 М бикарбонатом аммония ("Sigma", США), pH 7,8. Яд *Agkistrodon halys halys*, высушенный над влагопоглотителями, приобретали в Уззообъединении и Институте Зоологии и паразитологии АН РУз. Яд (300 мг) растворяли в 3,0 мл буфера, центрифугировали (центрифуга EBA 12, "Hettich", Германия, 10000 об/мин, 10 мин); супернатант наносили на колонку и элюировали буфером со скоростью 20 мл/час; фракции (всего восемь) собирали в объеме 5 мл (Uvicord S-II, Ultrorac 7200, "LKB", Швеция). Фракцию I, содержащую казеин/азоказеин- и фибриноген/фибрин-гидролизующую активность, далее наносили на колонку с TSK DEAE 650 ("Toyopearl"; 2,5×25 см) уравновешенную 0,005 М ацетатом аммония (pH 7,4), элюировали ступенчатым градиентом 0,025-0,5 М NaCl (Ultrograd 1130, "LKB"); фракции (1-8) собирали в объеме 5 мл. Яд кобры тестировали на азоказеиназную активность и способность лизировать тромбы из донорской крови.

* - адресат для переписки

Фибринолитическую активность и продукты деградации фибриногена определяли электрофоретически по [8] на Mini-Protean II ("Bio-Rad", США), согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Фибриноген быка ("Sigma") 1% (масса/объем), инкубировали с изучаемыми материалами (20:1 масса/масса) 5-180 мин (0,05 М трис-НСl, pH 7,6, 37°C), из смеси отбирали аликвоту, добавляли буфер нанесения (1:4), выдерживали 4 мин при 100°C и наносили на 10% ДСН-ПААГ.

Фибринолитическую активность изучали методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) [9] и фибриновых пластинах [10]. Фибрин готовили смешиванием 1 ед/мл тромбина человека (Каунас, Литва) с 2,5 мг/мл фибриногена быка ("Sigma") HEPES-NaCl буфере (HBS, 20 mM HEPES, 0,13 М NaCl) с 20 mM CaCl₂ в объёме 500 мкл при комнатной температуре. После перемешивания смесь разливали по 100 мкл в пробирки Эппендорф (1 мл). Сгустку фибрина давали сформироваться в течение 2 ч при комнатной температуре, затем добавляли исследуемые вещества, растворённые в HBS в объёме 20 мкл (20 мкг), инкубировали 15 ч при 37°C, после чего добавляли 50 мкл денатурирующего раствора (8 М мочевины, 4% β-меркаптоэтанол (объём/объём), 4% ДСН (масса/объём) и анализировали 12% ДСН-ПАГЭ. Фибриновые пластины готовили следующим образом: 16 мл (10 мг/мл) фибриногена быка, растворённого в 0,02 М трис-НСl буфере (pH 7,5), содержащем 0,15 М NaCl и 5 mM CaCl₂, наливали в чашки Петри (внутренний диаметр 94 мм) и добавляли 4-8 ед тромбина/мл (2000 ед/0,2 г, Каунас, Литва) и оставляли гель для формирования на 2 ч при 30°C. Исследуемые материалы (50 мкг/50 мкл) наносили на фибриновый гель и инкубировали 18 ч при 25°C. Затем пластины трижды промывали физ. раствором и измеряли диаметр образовавшейся зоны лизиса. Положительным и отрицательным контролями служили трипсин (5 мкг/50 мкл) и физ. р-р (50 мкл) соответственно.

Тромболитическую активность определяли по [11] с изменениями, которые заключались в замене измерения двух перпендикуляров размера тромба на измерение его влажной массы до и после инкубации. Доноров информировали о цели и задачах эксперимента; забор крови и её использование осуществляли с их согласия. Тромбы формировали в 500 мкл свежей крови при 37°C в течение 2 ч, в пробирках Эппендорф (1 мл) и инкубировали при той же температуре с 500 мкл тестируемых материалов (100-1000 мкг масса/объём) в течение 24 ч. Затем пробы центрифугировали 5 мин при 5000 об/мин (EBA 12), супернатант удаляли и оставшийся тромб взвешивали. Контрольный тромб инкубировали в тех же условиях с 500 мкл растворителя (0,9% NaCl). Убыль массы влажного тромба под действием тестируемых материалов отражала величину тромболитической активности.

Протеолитическую активность оценивали на субстратах: 1% казеине ("Calbiochem", США) и 0,25% азоказеине ("Sigma"). Казеин, 1 мл

(0,2 М трис-НСl буфер, pH 8,5) инкубировали 1 ч при 37°C с 1 мл тестируемого материала (100 мкг), добавляли 5% трихлоруксусную кислоту (ТХУ) (2 мл) и после 10-30 мин центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин (EBA 12). К 1 мл супернатанта добавляли 0,5 М Na₂CO₃ (5 мл) и реактив Фолина ("Sigma"; 1 мл, разведение 1:3); через 20 мин измеряли оптическую плотность супернатанта при 670 нм (Ultrospec III, "Pharmacia LKB"). В контроле к раствору фермента сначала добавляли 2 мл 5% ТХУ и далее обрабатывали как и опытную пробу. Единицы активности вычисляли по тирозиновому эквиваленту [12]. К 500 мкл азоказеина (0,2 М трис-НСl буфер, pH 8,5) добавляли исследуемые материалы (100 мкл), инкубировали 1 ч при 37°C, добавляли 10% ТХУ (500 мкл) и через 10-30 мин центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин (EBA 12) и измеряли оптическую плотность супернатанта при 390 нм (Ultrospec III). В контрольные пробы вместо тестируемых материалов вносили равный объём буфера [13, 14].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microcal Origin 5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биохимические характеристики ядов некоторых змей Центральной Азии были рассмотрены нами ранее [15]. Анализ их фибринолитической активности показал, что яд щитомордника 20 мкл (1 мг/мл) за 1 ч расщеплял α- и β-цепи фибриногена; γ-цепь в условиях эксперимента не гидролизировалась; протеолитический комплекс яда щитомордника активно расщеплял также фибрин (рис. 1А). Яд кобры в этих условиях умеренно гидролизировал α-цепь фибриногена и не действовал на β- и γ-цепи и не расщеплял азоказеин (данные не приведены). α-Фибриногеназа яда *N.n.atra* (атраза Б) также не действовала на азоказеин и фибрин; она ингибировала активацию классических и альтернативных путей системы комплемента [16]. Выделенный из яда *N. oxiana* гликопротеин оксиагин (гомолог репролизина ядов змей) ингибировал активацию системы комплемента сыворотки крови только по классическому пути [17]. Тест на пластинах фибрина показал, что ферменты яда кобры на фибрин не действовали (рис. 1Б). Необычный низкомолекулярный (6,5 кДа) фибрин(оген)олитический токсин из яда *Naja kaouthia* (лахирин), за 24 ч инкубации гидролизировал αβγ-цепи фибриногена (и фибрина), при этом о действии лахирина на традиционные субстраты протеаз не сообщалось, однако феномен подавления его активности со стороны ЭДТА позволил авторам сравнить его с NN-PF3 [18].

В следующей серии экспериментов изучали влияние разных количеств ядов на тромб, сформированный из свежей донорской крови. За 24 ч инкубации с ядом кобры (100-400 мкг) масса тромба не изменилась, тогда как яд щитомордника его массу уменьшал незначительно (данные не приведены). Поскольку содержание

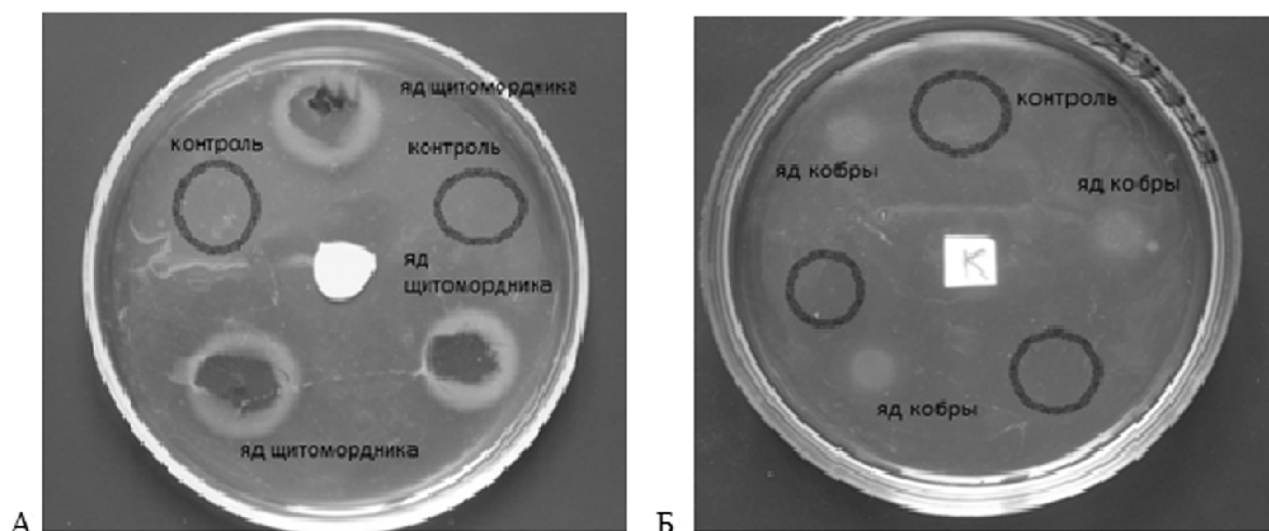


Рисунок 1. Действие на фибрин ядов щитомордника и кобры (по 50 мкг); А и Б соответственно.

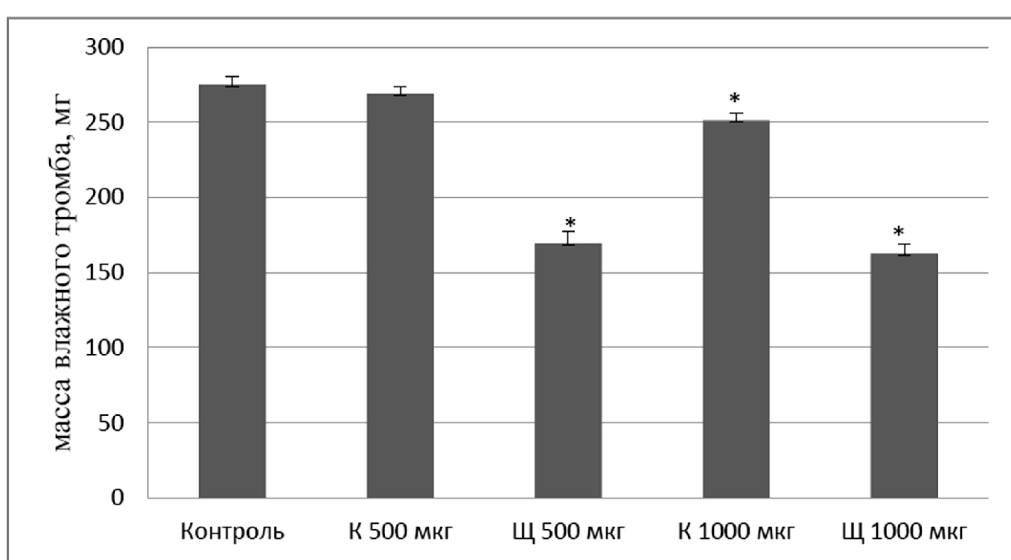


Рисунок 2. Тромболитическая активность ядов кобры (К) и щитомордника (Щ). Приведены средние значения ± стандартные отклонения (n=3), * - $p < 0,05$.

в крови человека ингибиторов протеолитических ферментов известно по [19], дозы тестируемых ядов увеличили до 500 и 1000 мкг/тромб. Как видно из приведённых на рисунке 2 данных, яд кобры (500 мкг/тромб) вызывал незначительное уменьшение его массы, а в дозе 1000 мкг – масса тромба уменьшилась с $274,8 \pm 5,6$ до $251 \pm 5,34$ мг.

Субстратная специфичность α -фибриногеназ ядов змей сем. *Elapidae* варьирует значительно. Так, α -фибриногеназа яда *N.nigricollis* (58 кДа) расщепляла фибриноген, фибрин и ингибировалась ЭДТА; её pH-оптимум установлен в диапазоне 8-10, величина pI – около 10 [5]. Фибриногеназа NN-PF3 из яда *N.n.naja* гидролизовала гемоглобин, казеин и желатин [20]. Таким образом, по гидролизуемым субстратам, чувствительности к ингибиторам, молекулярной массе, оптимуму pH и величине pI исследованный нами яд кобры (и выделенная из него

α -фибриногеназа [21]) сходны с ферментом из яда *N.nigricollis*. Подобные различия в способности гидролизовать фибрин *in vitro* и *in vivo* (в составе тромба) отмечены также для ферментов из ядов сем. *Crotalidae* (*A.c.contortrix*, *A.acutus* и др.) [5].

Яд щитомордника в дозе 500 мкг снижал массу тромба с $274,7 \pm 5,6$ до $169,44 \pm 7,0$, увеличение дозы до 1000 мкг приводило к уменьшению массы тромба до $162,59 \pm 6,7$ мг за 24 ч инкубации. Пролонгирование времени инкубации до 48 ч существенным образом на массу тромба не сказалось: в присутствии 1000 мкг она уменьшилась с $260,9 \pm 5,6$ до $144,375 \pm 4,85$ мг.

Следует подчеркнуть, что в условиях эксперимента тромбы полностью лизированы не были. Аналогичные данные были получены при изучении тромболитической активности негеморрагической фибриногеназы из яда *Protobothrops tokarensis* [10]. Таким образом, показана

ФИБРИНОГЕН/ФИБРИН-СПЕЦИФИЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ ЯДОВ ЗМЕЙ

способность яда щитомордника умеренно лизировать тромбы, сформированные из цельной крови человека. Вместе с тем известно, что яды кроталидов, единственным представителем которых в среднеазиатской фауне является *A.h.halyus*, содержат как про- так и антикоагулянты [22], в связи с чем дальнейшее изучение искомых активностей было продолжено разделением яда на TSK геле HW-50. В результате было получено восемь основных фракций (рис. 3А), тестирование которых показало, что фибриноген/фибрин-специфичные (рис. 4, 5)

и казеин/азоказеиназные активности локализуются во фракциях I, Ia и Ib. Тестирование протеиназной и фибриноген/фибриназной активностей во фракциях II-VIII их присутствия не выявило (рис. 4, 5). Известно, что высокомолекулярная часть яда щитомордника, кроме большого числа различающихся по специфичности протеиназ, включает также тромбиноподобный фермент (ТПФ), оксидазу L-аминокислот, гиалуронидазный комплекс, различные фосфатазы и т.д. [22].

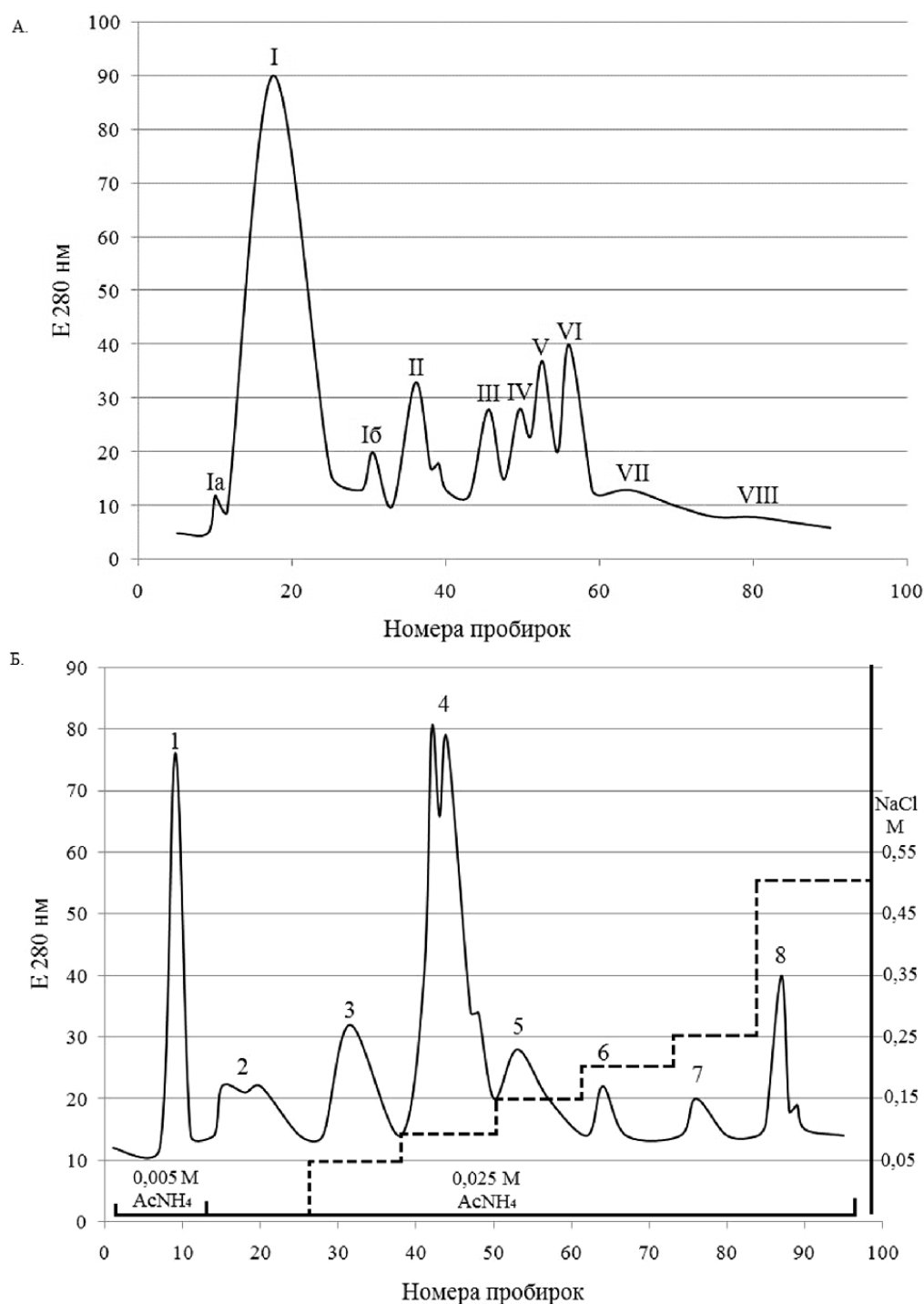


Рисунок 3. Фракционирование яда щитомордника на HW-50 (А, фракции I-VIII); фракция I на DEAE-650M (Б). Пунктиром обозначен ступенчатый градиент 0,025-0,5 М NaCl.

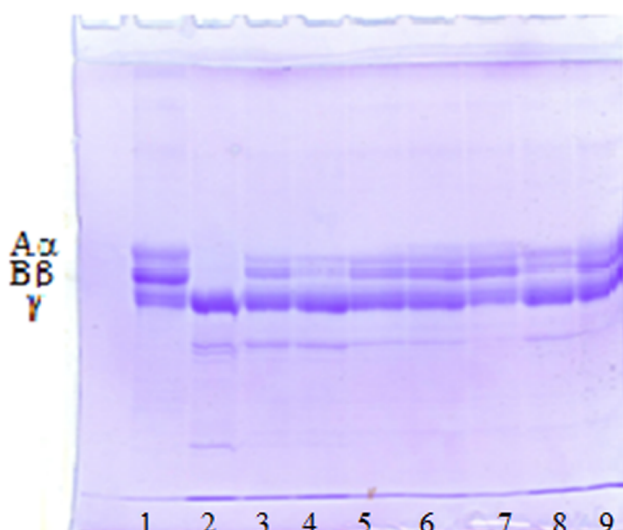


Рисунок 4. Гидролиз фибриногена быка (Fg) фракциями I-VIII (разделение на HW-50). Условия инкубации приведены в разделе “Методика”. Линии: 1- фибриноген; здесь и далее - фракции: 2 - I; 3 - II; 4 - III; 5 - IV; 6 - V; 7 - VI; 8 - VII; 9 - VIII.

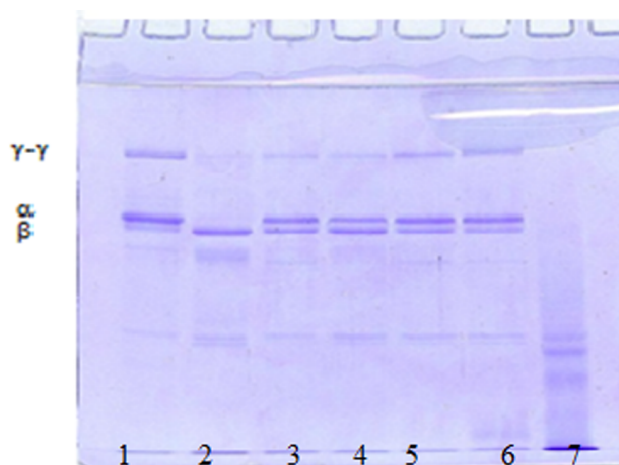


Рисунок 5. Действие фракций I-IV и VII (HW-50) на фибрин. Условия инкубации см. в разделе “Методика”. Линии: 1 - фибрин; 2 - I; 3 - II; 4 - III; 5 - IV; 6 - VII; 7 - белки-маркеры.

Поэтому, определив локализацию протеиназ во фракции I, было предпринято её разделение на соответствующие компоненты с использованием ионообменной хроматографии на DEAE-650. В результате было получено 8 основных фракций (рис. 3Б) с распределением казеин/азоказеиназной активностей по фракциям 1-6. При этом фракции 1-3 (20 мкг/мл) на донорской плазме существенно (в 1,9-2,2 раза) ускоряли время свертывания, то есть проявляли тромбиноподобное действие, наличие которого было установлено нами ранее [22]. В экспериментах по гидролизу фибриногена содержащими ТПФ фракциями 1-3 было показано, что за первые 5 мин инкубации, наряду с мгновенным (1-2 сек) формированием сгустка фибрина, также происходит гидролиз его α-цепи (рис. 6, дорожки 2, 3 и 4), а при увеличении времени инкубации до 180 мин гидролизуются

и β-цепь (рис. 7 дорожки 3, 4 и 5). Фракции 4-6, не сворачивающие фибриноген, расщепляли α- и β-цепи за 15 мин (данные не приведены), тогда как менее активные фракции 7-8 осуществляли гидролиз α- и β-цепи фибриногена за 180 мин (рис. 7, дорожки 9 и 10). Сходные с полученными нами параметры гидролиза фибриногена установлены для тромбиноподобных ферментов: анкрода (*Agkistrodon rhodostoma*), батроксобина (*Bothrops atrox moojeni*), кроталазы (*C. adamanteus*) и т.д. [23]. При этом ни содержащие ТПФ фракции 1-3, ни фракции 4-8 не осуществляли гидролиз γ-цепи фибриногена (рис. 7), что соответствует литературным данным, полученным для ядов *C. atrox* (атроксаза) и *A. contortrix* (фибролаза), – МП класса P-I [24], *A. acutus* (AAV1, МП класса P-III) [25] и *A. rhodostoma* (анкрод), также принадлежащего к сем. *Crotalidae* [19].

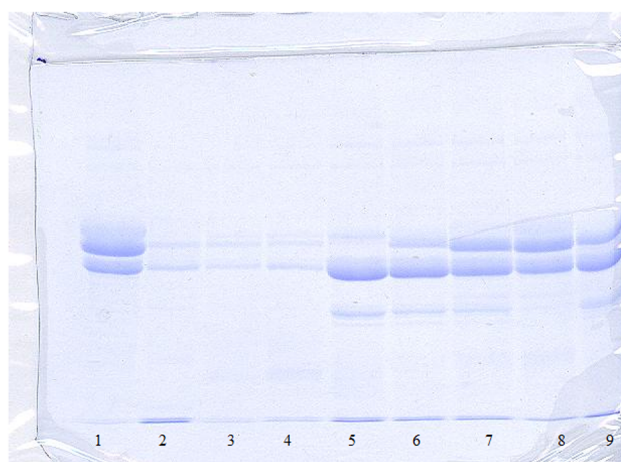


Рисунок 6. Действие фракций 1-8 (DEAE-650M) на фибриноген. Время инкубации 5 мин. Линии: 1 - фибриноген; 2 - 1; 3 - 2; 4 - 3; 5 - 4; 6 - 5; 7 - 6; 8 - 7; 9 - 8.

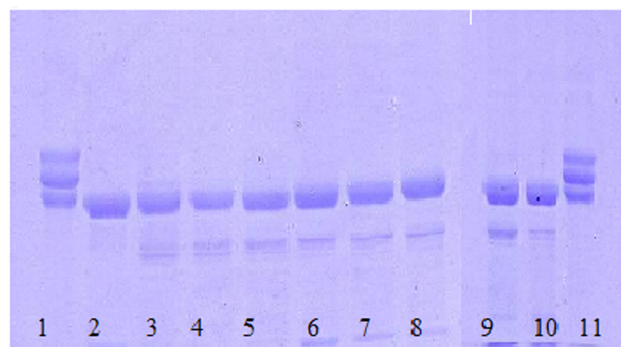


Рисунок 7. Действие фракций 1-8 (DEAE-650M) на фибриноген. Время инкубации 5 мин. Линии: 1 - фибриноген; 2 - I (HW-50); 3 - 1; 4 - 2; 5 - 3; 6 - 4; 7 - 5; 8 - 6; 9 - 7; 10 - 8.

Таким образом, образующие фракции 1-3 компоненты способны за 5-180 мин гидролизовать α- и β-цепи фибриногена. Это свидетельствует о том, что при использовании гелефильтрации и ионообменной хроматографии в яде щитомордника обнаружено присутствие тромбиноподобных и специфично расщепляющих фибриноген/фибрин ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Яд щитомордника *A.h.halys* гидролизует α - и β -цепи фибриногена, фибрин и *in vitro* демонстрирует способность лизировать тромбы из свежей донорской крови, что позволяет рассматривать его как потенциальный источник тромболитиков прямого действия.

Установлена способность фракций яда щитомордника, полученных при разделении на TSK геле HW-50 и DEAE-650 гидролизовать казеин/азоказеин и α - и β -цепи фибриногена (и фибрина); γ -цепь фибриногена (и фибрина) в условиях эксперимента не гидролизуются.

Фракции яда щитомордника *Agkistrodon halys halys* содержат протеиназы с мол. массой в диапазоне 23-35 кДа, способные гидролизовать фибриноген и фибрин; фермент из яда кобры (мол. масса 60 кДа) умеренно гидролизует α -цепь фибриногена [21]. Анализ тромболитической активности исследованных материалов выявил потенциальные возможности яда щитомордника как источника фибрин(оген)олитических ферментов. Последующее выделение этих ферментов в чистом виде и их функциональная характеристика позволят идентифицировать перспективные фибриноген/фибрин-специфичные ферменты и определить спектр их практического применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дрозд Н.Н., Мифтахова Н.Т., Савчик Е.Ю., Калинина Т.Б., Макаров В.А., Имбс Т.И., Звягинцева Т.Н., Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н. (2011) Экспер. клин. фармакол., **74**(5), 26-30.
2. Tu T. (1988) in: Hemostasis and animal venoms (Pirkle H., Markland F.S. Jr., eds), pp. 425-443.
3. Markland F.S. (1988) in: Hemostasis and animal venoms (Pirkle H., Markland F.S. Jr., eds), pp. 149-172.
4. Swenson S., Markland F.S. Jr. (2005) Toxicon, **45**, 1021-1039.
5. Markland F.S. Jr., Swenson S. (2013) Toxicon, **62**, 3-18.
6. Fox J.W., Bjarnason J.B. (1998) in: Enzymes from snake venom (Bailey G.S., ed.), Alaken Inc., pp. 599-633.
7. Swenson S., Toombs C.F., Pena L., Johansson J., Markland F.S. Jr. (2004) Current Drug Targets - Cardiovascular & Haematological Disorders, **4**, 417-435.
8. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
9. Gremski L.H., Chaim O.M., Paludo K.S., Sade Y.B., Otuki M.F., Richardson M., Gremski W., Sanchez E.F., Veiga S.S. (2007) Toxicon, **50**, 120-134.
10. Oyama E., Kitagawa Y., Takahashi H. (2013) Toxicon, **70**, 153-161.
11. Cintra A.C.O., De Toni L.G.B., Sartim M.A., Franco J.J., Caetano R.C., Murakami M.T., Sampaio S.V. (2012) Toxicon, **60**, 70-82.
12. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения протеолитической активности. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53974-2010. М.: Стандартинформ, 9 с.
13. Siigur J., Samel M., Tõnismägi K., Subbi J., Siigur E., Tu A.T. (1998) Thromb. Res., **90**, 39-49.
14. Chakrabarty D., Datta K., Gomes A., Bhattacharyya D. (2000) Toxicon, **38**, 1475-1490.
15. Садыков Э.С., Юнусова Э.С., Султаналиева Н.М., Шкинев А.В. (2013) ДАН РУз, №2, 40-42.
16. Sun Q.Y., Bao J. (2010) Toxicon, **56**, 1459-1469.
17. Shoibonov B.B., Osipov A.V., Kryukova E.V., Zinchenko A.A., Lakhtin V.M., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. (2005) Molecular Immunology, **42**, 1141-1153.
18. Sekhar C.C., Chakrabarty D. (2011) J. Biosci., **36**, 355-361.
19. Guan A.L., Retzios A.D., Henderson G.H., Markland F.S. Jr. (1991) Arch. Biochem. Biophys., **289**(2), 197-207.
20. Jagadeesha D.K., Shashidhara Murthy R., Girish K.S., Kemparaju K. (2002) Toxicon, **40**, 667-675.
21. Юнусова Э.С., Садыков Э.С., Шкинев А.В., Султаналиева Н.М. (2013) Химия природных соединений, №4, 610-612.
22. Калмыкова И.Б., Зайченко О.Б., Садыков Э.С., Барабаничкова Н.А., Юкельсон Л.Я. (1990) Вопросы мед. химии, №2, 12-14.
23. Matsui T., Fujimura Y., Titani K. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1477**, 146-156.
24. Fox J.W., Serrano S.M.T. (2005) Toxicon, **45**, 969-985.
25. Wang W.J. (2007) Biochimie, **89**, 105-115.

Поступила: 02. 02. 2016.
Принята к печати: 05. 04. 2016.

FIBRINOGEN/FIBRIN-SPECIFIC ENZYMES FROM COPPERHEAD (*Agkistrodon halys halys*) AND COBRA (*Naja oxiana Eichwald*) SNAKE VENOMS

E.S. Yunusova, E.S. Sadykov, N.M. Sultanaliyeva, A.V. Shkinev

Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbekistan Academy of Sciences,
83 Mirzo Ulugbek str., Tashkent, 100125 Republic of Uzbekistan; tel.: +998712623540; e-mail: rexa83@yandex.ru

Ability of fractions of cobra's (*Naja oxiana Eichwald*) and copperhead snake's (*Agkistrodon halys halys*) venoms to hydrolyze fibrinogen/fibrin was studied. In cobra's snake a component with molecular mass of nearly 60 kDa was found to hydrolyze α -chain of fibrinogen but failed to hydrolyze casein/azocasein and fibrin. A fibrinogen-specific metalloproteinase, the enzyme was inhibited by EDTA. Cobra's venom reduced the mass of donor's fresh blood clots. The copperhead snake's venom and the fractions obtained by gel-filtration (HW-50) and ion exchange chromatography (DEAE-650) were found to hydrolyze casein/azocasein, α - and β -chains of fibrinogen/fibrin and donor's blood clots. The results from the study of the venom and proteolytically active fractions are the evidence for a thrombolytic potential in a copperhead snake's venom.

Key words: snake venoms, chromatography, proteinases, fibrin(ogen)ases, thrombolytic activity