



УДК 547.963:544.42:537.533.35

Обратимо-диссоциирующие белковые олигомеры (гемоглобин и его олигомерные производные)

Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Мишаева Р.Н.

Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация

Методами гельпроникающей хроматографии и ультрафильтрации исследован процесс ассоциации-диссоциации молекул гемоглобина и его олигомерных производных на димеры субъединиц в водных и водно-солевых растворах. Впервые проведена количественная оценка содержания димеров субъединиц в нативном и олигомерном гемоглобине. Показано, что химическая сшивка стабилизирует четвертичную структуру гемоглобина в его олигомерных производных.

Ключевые слова: гемоглобин, олигомеры, ассоциация-диссоциация, гельпроникающая хроматография, ультрафильтрация

The process of association-dissociation of hemoglobin molecules and their oligomers into dimers of its subunits in water solutions is studied by the method of ultrafiltration and gel-penetrating chromatography. The quantitative assessment of stabilization of quaternary structure of hemoglobin in chemically bound oligomer derivative in comparison with native protein on the basis of building differential concentration curves is conducted for the first time.

Keywords: hemoglobin, oligomers, association-dissociation, gel-penetrating chromatography, ultrafiltration

Введение

Исследование обратимо-диссоциирующих биологических систем является сложной задачей, так как структура и, соответственно, функция такой системы зависит от многих параметров (концентрации, рН, ионной силы и состава раствора, температуры, времени и т.п.). Кроме того, анализ таких систем с помощью динамических методов (например, ультрафильтрации и гельпроникающей хроматографии) осложняется тем обстоятельством, что в процессе самой аналитической процедуры происходят как качественные, так и количественные изменения в структуре исследуемого объекта.

Удобным объектом для изучения обратимо-диссоциирующих систем является белок гемоглобин (Гб). Однако для исследований такого рода необходим Гб высокой степени очистки, поскольку наличие в растворе Гб большого набора растворимых компонентов неопределенного состава не позволяет однозначно трактовать полученные экспериментальные результаты.

Обычно раствор Гб получают при разрушении эритроцитов путем осмотического гемолиза с последующим удалением нерастворимых клеточных фрагментов (стромы) центрифугированием. Полученный гемолизат содержит раствор Гб в высокой концентрации, а также растворимые компоненты мембран эритроцитов, продукты клеточного метаболизма, не имеющие определенных функциональных и молекулярных характеристик. В литературе описаны способы очистки Гб от примесей методами аффинной хроматографии [1], вытеснительной препаративной ВЭЖХ [2], ионообменной хроматографии с применением катионных и анионных систем [3]. Предлагаемые обычные хроматографические методы предусматривали предварительную сорбцию Гб из раствора гемолизата с последующим его вытеснением (десорбцией) в градиенте рН или концентрации соли элюирующего раствора.

Целью работы является изучение Гб и его олигомерных производных в растворе методами ультрафильтрации (УФ) и гельпроникающей хроматографии (ГПХ) для определения возможности стабилизации четвертичной структуры Гб путем химической сшивки с помощью бифункционального сшивающего агента – глутарового альдегида, а также оценка возможности очистки концентрированных растворов Гб из гемолизата эритроцитов от растворимых клеточных примесей в статических условиях на анионите в условиях селективного поглощения примесей и отсутствия сорбции Гб.

Эксперимент

Исследование процесса диссоциации на $\alpha\beta$ -димеры молекулы Гб как в растворе, так и в форме сшитой макромолекулы олигогемоглобина (ОГб) проводили методами гельпроникающей хроматографии (ГПХ) и ультрафильтрации (УФ) [4].

ГПХ осуществляли на колонке с ультрагелем марки АсА-44 (фирма LKB, Швеция), размер 55x1.6 см, диапазон разделения по белкам 130-10 кДа, калибровка по реперным белкам (таблица 1). Калибровочную кривую строили в координатах $K_{av} - \lg MM$, где $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$ - средний коэффициент распределения; V_0 и V_t - объемы элюции с колонки декстрана синего-2000 и KI, соответственно; V_e – объем элюции исследуемого белка.

Таблица 1. Калибровочные параметры белковых маркеров (ультрагель АсА 44)

Маркер	ММ, Да	lg ММ	K_{av}
Декстран синий	2000000	6.30	0.00
Мышечная альдолаза	120000	5.08	0.07
Сывороточный альбумин	68000	4.83	0.30
Супероксиддисмутаза эритроцитарная	32000	4.51	0.55
Химотрипсिनоген А	25000	4.40	0.59
Цитохром С	12300	4.09	0.81
КJ	166	2.22	1.00

На основе гельхроматограммы выделяли фракции, относящиеся к гемоглобину или внутримолекулярно сшитому Гб и строили дифференциальные элюционные профили по методу [5].

Ультрафильтрацию проводили в ячейке фирмы «Amicon» (США) площадь 25.5 см^2 , давление 0.1 атм. как в режиме диафильтрации, так и в режиме концентрирования. Использовали полисульфоновые мембраны (марка 14650, фирма «Владипор», Россия) с отсечением по молекулярной массе белков 50 кДа и ацетатцеллюлозные мембраны (марка ХМ-100, фирма «Diaflo», США) с пределом отсечения по белкам 100 кДа.

Гб получали из тщательно отмытых эритроцитов крови человека путем осмотического гемолиза водой, удаления нерастворимых клеточных фрагментов центрифугированием при 34000g, удаления высокомолекулярных растворимых клеточных продуктов ультрафильтрацией и проведения стерилизующей фильтрации. Полученный раствор нативного Гб имел концентрацию $\sim 50 \text{ мг/мл}$, рН 6.6. Концентрацию Гб и ОГб определяли спектрофотометрическим методом по ацетонциангидриновому производному при $\lambda 540 \text{ нм}$ [6]. Запись гельхроматограмм проводили при 254 нм. Олигомерные производные Гб получали его поликонденсацией с бифункциональным сшивающим агентом – глутаровым альдегидом при вариации условий сшивки. Реакцию останавливали боргидридом натрия. Известно, что при такой химической модификации образуются как внутримолекулярные мостики, связывающие субъединицы Гб за счет образования ковалентных связей между аминокруппами одной молекулы белка и альдегидными группами глутарового альдегида, так и межмолекулярные связи, образующиеся при взаимодействии глутарового альдегида с аминокруппами, принадлежащими разным молекулам Гб, при этом в результате синтезируются макромолекулы олигомерного гемоглобина [7]. Оценку средневесовой (M_w) молекулярной массы ОГб проводили по ранее разработанной методике [8].

В работе использовали анионит ЭДЭ-10п (Завод пластмасс, Нижний Тагил, РФ). Сорбционные эксперименты в статическом варианте проводили с анионитом (размер зерен 0,1-0,2 мм) в смешанной ОН-Сl-форме, получаемой титрованием ОН-формы анионита раствором 0,2 н НСl в 0,15 н NaCl до соответствующего равновесного значения рН.

Присутствие растворимых стромальных компонентов в гемолизате и очищенных растворах Гб определяли визуально по помутнению раствора (выпадению осадка) при добавлении к нему насыщенного раствора сульфата аммония в объемном соотношении 1:1. Наличие растворимых фосфолипидов оценивали количественно с использованием гидроксилamina и хлорного железа [9]. N-содержащие белковые компоненты анализировали на содержание общего азота модифицированным микрометодом Кьельдаля [10]. Р-содержащие компоненты определяли методом Фиске-Субарроу [11]. В основу иммунологического метода анализа стромальных примесей был положен способ приготовления препаратов мембран [12].

В качестве основы кровезаменителя – переносчика кислорода используют Гб, сохраняющий практически полную физиологическую активность, что требует жестких ограничений при получении и работе с его растворами – узкого диапазона значений ионной силы, рН, температуры, максимально короткого времени контакта с сорбентом. В связи с этим для очистки Гб из растворов гемолизата, содержащих Гб в высоких концентрациях, мы предложили и исследовали фронтальный вариант метода анионообменной жидкостной хроматографии в условиях, при которых отсутствует сорбция основного белка – Гб, но селективно поглощаются из гемолизата примесные растворимые компоненты [13]. Было показано, что разработанный динамический метод обеспечивает получение очищенного Гб с сохранением его биологической активности и функциональных свойств.

В настоящем сообщении приводится разработанный и исследованный нами метод очистки Гб в статических условиях. Для этого был определен оптимальный состав смешанной ОН-СI-формы анионита при котором поглощение стромальных примесей в этих условиях является максимальным. Анионит титровали до установления определенного рН равновесного раствора ($pH_{равн}$), затем раствор удаляли центрифугированием. Сорбцию примесей из гемолизата проводили в статических условиях с перемешиванием в течение 2 ч при весовом соотношении анионит:Гб = 1:1. После удаления анионита центрифугированием и осаждения Гб определяли в супернатанте содержание примесных Р-содержащих компонентов. Количество поглощенных сорбентом примесей оценивали по разности концентраций до и после сорбции. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Зависимость сорбции Р-содержащих компонентов из раствора гемолизата эритроцитов в статических условиях от значения $pH_{равн}$ анионита. Весовое соотношение анионит/Гб = 1 г/г; C_p - количество сорбированного фосфора (мкг/г сорбента); ; $C_p / C_p \text{ исх}$ – относительное количество сорбированного фосфора (% от исходного содержания в гемолизате)

рН	C_p	$C_p / C_p \text{ исх}$
4.4	428	54
5.0	528	65
5.7	614	72
6.9	555	65
7.2	534	63
7.5	428	62
8.2	455	57
8.5	348	45
8.8	320	42
9.3	200	33
10.3	148	26

Максимум поглощения Р-содержащих примесей наблюдали для образца анионита, оттитрованного до рН 5.5-5.7, когда ионизованы все три вида анионообменных групп. Но для сохранения биологической активности Гб оптимальным выбран диапазон равновесных значений рН анионита 6.5 – 7.7, при которых Гб меньше подвержен автоокислению, а поглощение примесей остается значительным даже в статических условиях сорбции.

Для контроля степени очистки концентрированных растворов Гб от стромальных загрязнений, содержащихся в гемолизате был использован чувствительный иммунологический тест по образованию комплекса антигена (в растворах очищенного Гб и исходного гемолизата) с антителами (в антисыворотке), образовавшимися в сыворотке крови кролика, предварительно иммунизированного гомогенатом стромы. Образование комплекса антиген-антитело контролировали по реакции кольцепреципитации. Для этого использовали растворы исходного гемолизата и очищенного 5 % раствора Гб, полученного после сорбции в статических условиях растворимых стромальных примесей, в условиях вариации весового соотношения анионит/ Гб (табл. 3).

Таблица 3. Результаты иммунологического анализа исходного гемолизата эритроцитов и раствора гемоглобина, очищенного на анионите в статических условиях. Перемешивание, 20° С, С_{Гб} 48 мг/мл, рН 6,6, размер частиц анионита 90-160 мкм

Образец	Количество анионита, г	Соотношение анионит/Гб, г/г	Показатель иммунной реакции (в баллах)
Исх. гемолизат	-	-	2+
Гомогенат мембран эритроцитов (стромы)	-	-	4+
1	0.10	0.2	1+
2	0.50	1.0	0
3	0.75	1.5	0
4	1.00	2.0	0
5	1.50	3.0	0
6	2.00	4.0	0

Сорбцию примесей проводили при слабом перемешивании и пониженной температуре, рН раствора поддерживали на уровне 6,6 – 7,2 путем добавления 0,01 н водного раствора NaOH. Дисперсию анионита отделяли центрифугированием. Образование колец преципитации оценивали по системе, где гомогенат стромы по реакции преципитации оценивался как 4+ (по пятибалльной шкале), исходный гемолизат как 2+, отсутствие следов стромы 0. Оценку давали через 2 ч после наслаивания антисыворотки на исследуемый образец, инкубацию проводили при 25° С. Из данных иммунологического анализа на строму (табл. 3) следует, что в растворах Гб, очищенного на анионите в статических условиях при вариации весового соотношения анионит / Гб от 1.0 до 4.0, стромальные примеси отсутствуют. При соотношения 0.2 наличие примесей можно объяснить недостаточным количеством сорбента.

Исследования процесса ассоциации-диссоциации молекул Гб проводились на полученных образцах высокоочищенного Гб. Известно, что молекула Гб, молекулярная масса (ММ) которого по аминокислотному составу составляет 64.5 кДа, обладает четвертичной структурой и состоит из 4 субъединиц (ММ 16 кДа): двух α - и двух β -полипептидных цепей с гемовой группой, связанных между собой солевыми мостиками. Функционально активной является молекула Гб ($\alpha_2\beta_2$) [14]. В водных растворах молекула Гб $\alpha_2\beta_2$ способна диссоциировать на 2 неактивных $\alpha\beta$ -димера субъединиц гемоглобина с ММ 32 кДа, которые структурно наиболее стабильны. В выделенном из эритроцитов и лишенном эритроцитарной среды водном растворе гемоглобина существует динамическое равновесие между тетрамерной и димерной формами $\alpha_2\beta_2 \leftrightarrow 2\alpha\beta$, которое при изменении условий легко может смещаться в сторону диссоциации, приводя к снижению биологической активности Гб. Структурные изменения в молекуле Гб в процессе диссоциации-ассоциации связаны с разрушением - образованием солевых мостиков, стабилизирующих его четвертичную структуру, которая существует в узком диапазоне рН, ионной силы и концентрации белка [15-17].

Для сохранения функциональной активности Гб – переноса кислорода в физиологических условиях из легких в ткани - очень важным моментом является стабилизация четвертичной структуры его молекулы, поскольку диссоциация на неактивные $\alpha\beta$ -димеры может служить причиной нефротоксичности растворов Гб

при введении их в кровеносное русло в качестве кровезаменителя и снижения его газотранспортной функции.

В экспериментах по ультрафильтрации растворов Гб было обнаружено, что в растворе, прошедшем через мембрану (пермеат), содержится Гб, молекулы которого не должны проходить через мембрану Владипор, отсекающую белки с ММ 50 кДа, при ММ Гб по аминокислотному составу 64.5 кДа и размере его молекулы 6.4x5.5x5.0 нм [18]. Наблюдаемый результат объясняется диссоциацией тетрамерной молекулы Гб на $\alpha\beta$ -димеры. Удаление $\alpha\beta$ -димеров из раствора в ячейке при диафильтрации приводит к сдвигу равновесия ассоциация-диссоциация в сторону дальнейшей диссоциации Гб, так что в пределе происходит полный перенос $\alpha\beta$ -димеров через мембрану. Проведение ультрафильтрации в режиме концентрирования показало, что степень диссоциации Гб на $\alpha\beta$ -димеры зависит от его концентрации в растворе (табл. 4). Нужно отметить, что в случае растворов ОГб даже при низкой концентрации белка 0.5 мг/мл, рН 6.4, эта мембрана вообще не пропускает макромолекулы белка.

Таблица 4. Диссоциация тетрамера Гб на $\alpha\beta$ -димеры в зависимости от его концентрации в растворе при ультрафильтрации через мембрану Владипор с отсечением по ММ 50 кДа в режиме концентрирования, объем раствора Гб 30 мл, 0.15M NaCl, рН 6.6

С _{Гб} исходная, мг/мл,	Содержание Гб в ячейке, %	Содержание Гб в пермеате, %
48	84	16
20	73	27
1- 2.5	0	100

Равновесие в системе ассоциация-диссоциация белковых субъединиц обычно наблюдается при очень низких концентрациях белка, для изучения которых пригодны в основном спектрофотометрические методы. Акерс с сотр. разработали на основе ГПХ анализ самоассоциирующих систем для макромолекул, имеющих дискретную, точно известную молекулярную массу [5,19,20]. Используя гельхроматограмму, снятую в определенных условиях, строили дифференциальный концентрационный (элюиционный) профиль, характеризующий зависимость коэффициента распределения от молекулярного размера данного компонента и гелевой пористости носителя. Каждый компонент ассоциирующей-диссоциирующей белковой системы распределяется в процессе гельхроматографии согласно скоростям достижения равновесия из-за разной скорости миграции. В результате элюиционные профили имеют резкую переднюю границу и диффузную заднюю и не являются точно гауссовыми, причем негауссова форма распределения профилей элюции тестируется экспериментально. Коэффициент распределения зависит не только от молекулярного (стоксовского) размера белка, но также от скорости элюиционного потока, гелевой пористости и других факторов.

Метод анализа с помощью ГПХ дает возможность детектировать степень полидисперсности в системе макромолекул (молекулы Гб и его $\alpha\beta$ -димеры) при соблюдении строгих условий проведения ГПХ: малые количества вещества, низкая скорость протекания элюирующего раствора через колонку. Для Гб и ОГб помимо выше приведенных необходимых мы использовали условия, благоприятствующие диссоциации Гб на $\alpha\beta$ -димеры - низкую ионную силу раствора и диапазон рН 6.0-6.6 [15-17].

Методом ГПХ растворов Гб и ОГб при скорости элюции 10 мл/ч выделяли фракции, относящиеся к Гб или внутримолекулярно сшитому Гб, вытесняемому с колонки с объемом элюции, как у нативного Гб, и строили дифференциальные концентрационные (элюционные) профили этих пиков по методу [5] в координатах абсолютных величин $[\Delta D/\Delta V]$, (что соответствует $dC_{Гб}/dV$) против V (мл) протекшего раствора.

Нативный Гб (4 мг) в 0.05М фосфатном буфере, рН 7.2 (в условиях наибольшей стабильности его молекулы), в динамическом режиме элюируется с колонки с ультрагелем АсА-44 в виде пика, соответствующего ММ 46 - 47 кДа (вместо теоретической 64.5) (рис. 1а). При построении дифференциального элюционного профиля Гб по методу Акерса в координатах $[\Delta D/\Delta V] - V$ (мл) (рис. 1б) получены 2 пика, соответствующие разной степени ассоциации Гб в растворе, первый с содержанием 55% Гб можно отнести к тетрамерной его форме (ММ по калибровке ~ 50 кДа), и второй, составляющий ~ 45%, - к его $\alpha\beta$ -димерам (ММ ~ 29 кДа). Как следует из рис. 1а,б, раствор представляет смесь молекул Гб и его $\alpha\beta$ -димеров почти в равных отношениях.

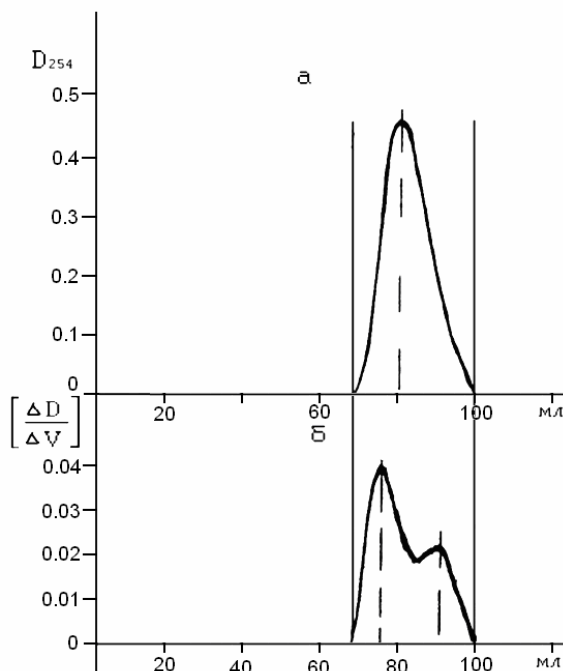


Рис. 1. ГПХ на ультрагеле АсА-44 раствора Гб в 0.05М фосфатном буферном растворе, рН 7.2, в координатах оптическая плотность D_{254} – объем элюции V мл (а); дифференциальный элюционный профиль ГПХ пика Гб в координатах абсолютных величин $[\Delta D/\Delta V] - V$ мл (б); I пик относится к тетрамерной форме Гб; II пик – к $\alpha\beta$ -димерам субъединиц Гб

В «жестких» условиях динамического процесса (вода, рН 6.0, малая скорость элюции) содержание неактивных $\alpha\beta$ -димеров субъединиц достигает 80-90% (ММ 30-35 кДа), при этом четвертичная структура молекулы гемоглобина практически не сохраняется (рис. 3а,б), что видно из сопоставления гельхроматограмм нативного Гб в условиях полного сохранения тетрамерной структуры (рис. 3 а) и отдиализованного против воды (рис.3 б).

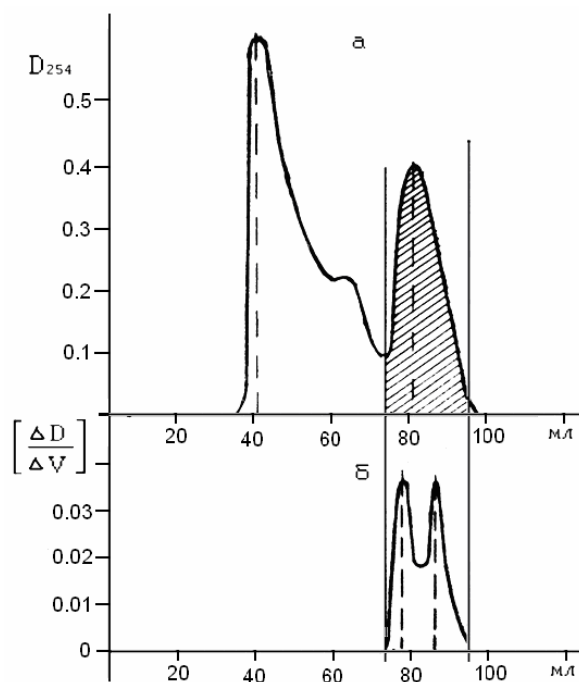


Рис. 2. ГПХ на ультрагеле АсА-44 раствора ОГб (M_b 160 кДа) 0.07M NaCl, pH 6.2, в координатах оптическая плотность D_{254} – объем элюции V мл (заштрихован пик внутримолекулярно сшитого Гб) (а); дифференциальный элюционный профиль ГПХ пика внутримолекулярно сшитого Гб в координатах абсолютных величин $[\Delta D/\Delta V] - V$ мл (б); I пик относится к тетрамерной форме Гб; II пик – к $\alpha\beta$ -димерам субъединиц Гб

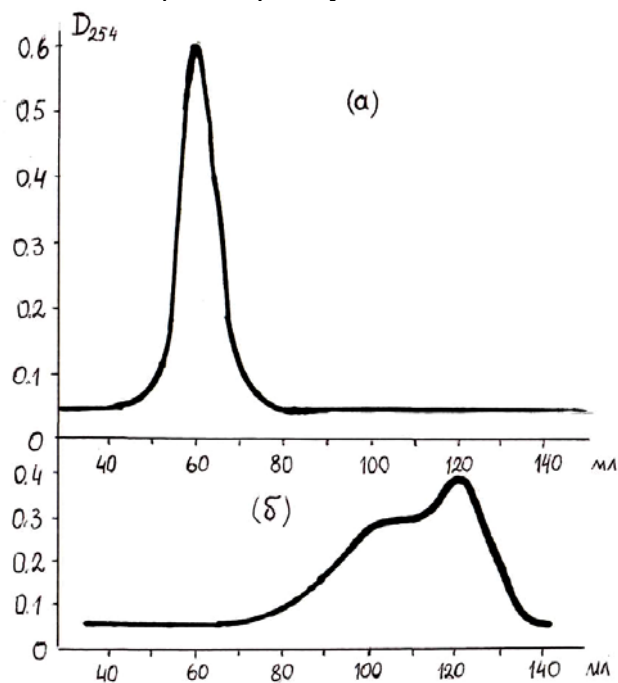


Рис. 3. ГПХ на ультрагеле АсА-54: а) раствора нативного Гб, элюент 0.05 м фосфатный буфер, pH 7.4; б) раствора нативного Гб, отдиализованного против воды, элюент 0.3 % NaCl

Влияние химической сшивки молекул Гб в олигомерные макромолекулы на их способность к диссоциации на $\alpha\beta$ -димеры, для растворов ОГб, различающихся M_v , исследовали методом ГПХ в условиях, благоприятствующих диссоциации молекулы Гб на $\alpha\beta$ -димеры. Сначала на колонке с ультрагелем АсА-44 отделяли высокомолекулярную фракцию ОГб, выделяли и исследовали «низкомолекулярный» белковый компонент, имеющий коэффициент распределения, близкий нативному Гб, и являющийся внутримолекулярно модифицированным Гб (рис. 2а, пик заштрихован), строили для него дифференциальный элюиционный профиль и оценивали полидисперсность «низкомолекулярной» фракции ОГб (рис. 2б). Результаты ГПХ для растворов ОГб с M_v 160 кДа и 280 кДа представлены в табл. 5 и 6. Видно, что при увеличении M_v происходит уменьшение количества внутримолекулярно сшитого Гб. При этом в «жестких» условиях меньшее количество $\alpha\beta$ -димеров «вырывается» из макромолекул Гб (от 5.4 до 2.9%) по сравнению с 80-90% для нативного Гб в воде. Полученные результаты показывают, что химическая сшивка стабилизирует четвертичную структуру Гб в макромолекуле ОГб.

Таблица 5. Гельхроматографический анализ на ультрагеле АсА-44 растворов ОГб в условиях диссоциации гемоглобина на $\alpha\beta$ -димеры. (10 мг ОГб, скорость элюции 10 мл/ч, рН 6.2, 0.07М NaCl)

Образец, M_v , кДа	Соотношение высокомогл.- низкомогл. фракций ОГб, %	M_v (макс.) «пика» Гб (низкомогл. фракции ОГб), кДа
ОГб 160	65/35	52.5 – 56.2
ОГб 280	70/30	37 - 38

Таблица 6. Гельхроматографический анализ низкомолекулярной фракции ОГб («пик» Гб), (условия в табл. 5).

Образец, M_v , кДа	Дифференциальный элюиционный профиль «пика Гб» ($[\Delta D/\Delta V]$ против $V_{мл}$)				Соотношение тетрамер/ $\alpha\beta$ - димер в «пике Гб», %	Свободные $\alpha\beta$ - димеры в ОГб, %
	пик I, %	пик II, %	пик I, кДа	пик II, кДа		
ОГб 160	53	47	64.5	39.8	18/16	5.4
ОГб 280	65	35	43.7	26.3	19/10	2.9

Заключение

Методами ультрафильтрации и ГПХ изучено динамическое равновесие процесса ассоциации-диссоциации четвертичной структуры Гб ($G_b (\alpha_2\beta_2) \leftrightarrow 2 \alpha\beta$) в водных растворах Гб и ОГб, полученного поликонденсацией Гб с глутаровым альдегидом.

Построение дифференциальных элюиционных профилей по методу Акерса для Гб и олигомерного (химически сшитого) Гб позволило впервые количественно

оценить содержание тетрамеров и димеров субъединиц в нативном и олигомерном Гб и их средние молекулярные массы.

Показана существенная стабилизация четвертичной структуры Гб в олигомерном производном по сравнению с нативным Гб (содержание 2-9% димеров в олигомере по сравнению с 80-90% в растворе Гб).

Список литературы

1. Patent US. 2002. N 6 365.147. В 1. Int. Cl. A01N 63/00. Methods for removing endotoxins from biological solutions using immobilized metal affinity chromatography.
2. Christensen S. M., Midina F., Winslow R.W., Snell S.M., Zegna A., Marini M.A. Preparation of human hemoglobin A₀ for possible use as a blood substitute//J. Biochem. Biophys. Methods. 1988. V.17. N 2. P. 143-154
3. Williams R.C.Jr., Kuo-Yi Tsay. A convenient chromatographic method for the preparation of human hemoglobin // Analyt. Biochem. 1973. V.54. N 1. P.137-145.
4. Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Мишаева Р.Н., Березецкая Е.Ф., Вылегжанина М.Э., Суханова Т.Э., Панарин Е.Ф. Ассоциация-диссоциация молекул гемоглобина и полимерного гемоглобина в растворах// Прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С.237-242.
5. Ackers G.K. Analytical gel chromatography of proteins// Adv. Protein Chem. 1970. V. 24. P.343-446.
6. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина.1968. Л. Медицина. С.23.
7. Кузнецова Н.П., Кленин С.И., Волкова Л.А., Гудкин Л.Р., Самсонов Г.В. Поликонденсация биополимеров и морфология образующихся продуктов // Высокомолек. соед. 1989. Т. 31А. № 7. С. 1539-1543.
8. Кузнецова Н.П., Самсонов Г.В. Исследование поликонденсации макромолекулбиополимеров//Высокомолек.соед. 1985. Т.27А. №12. С. 2611.
9. Доусон Р. и др. Справочник биохимика.1991. М. Мир. С.407.
10. Петрунькина А. М. Практическая биохимия. 1961. М. Медгиз. С.127.
11. Fiske C. H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorous//J. Biol. Chem. 1925. V. 66. P.375.
12. Биохимическое исследование мембран под ред. Мэдди Э. 1979. М. Мир. С. 334-372.
13. Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Гудкин Л.Р. Сорбционная очистка концентрированных растворов гемоглобина// Журнал прикладной химии. 2007. т. 80. Вып. 9. С. 1566-1570.
14. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with Ligands. Amsterdam-London: North-Holland Publ.Corp.,1971. V.21. 436 p.
15. Rossi-Fanelli A., Antonini E., Caputo A. Hemoglobin and mioglobin // Adv. Protein Chem. 1964. V. 19. P. 73-215.
16. Imai K., Yonetani T. The hemoglobin-oxigen equilibrium associated with subunits dissociation. I. An approach with the Hil-scheme // Biochem. Biophys. Acta. 1977. V. 490. № 1. P. 164-170.
17. Kellett G.L., Schachman H.K. Dissociation of hemoglobin into subunits: monomer formation and influence of ligands // J. Molec. Biol. 1971. V. 59. № 2, P. 387-399.
18. Перутц П.// Молекулы и клетки / Ред. Г.М. Франк. М.: Мир, 1966. С. 7-29.
19. Zimmerman J.K., Ackers G.K. Gel Filtration Studies of Oxyhemerythrin // J. Biol.Chem. 1971. V. 246. № 4. P. 1078-1087.

20. Zimmerman J.K., Cox D.J., Ackers G.K. Molecular Sieve Studies of Interacting Protein Systems // J. Biol. Chem. 1971. V. 246. № 13. P. 4242-4250.

Кузнецова Нина Петровна - д.х.н., главный научный сотрудник, Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург.

Гудкин Лев Романович - к.х.н., старший научный сотрудник, Институт Высокомолекулярных РАН, Санкт-Петербург.

Мишаева Римма Никодимовна - к.х.н., старший научный сотрудник, Институт Высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург

Kuznetsova Nina P. – Dr.Sci., the main scientific worker, the Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg.

Gudkin Lev R. – Ph.D., senior researcher, the Institute of Macromolecular Compounds RAS, St. Petersburg

Mishaeva Rimma N. – Ph.D., senior researcher, the Institute of Macromolecular Compounds RAS, St.Petersburg