

**Гемоглобин: модификации, кристаллизация, полимеризация (обзор)**В. А. Сергунова<sup>1</sup>, Е. А. Манченко<sup>1,2</sup>, О. Е. Гудкова<sup>1</sup><sup>1</sup> НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского,  
Россия, 10703, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2<sup>2</sup> Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова  
Россия, 119234, г. Москва, Университетская пл., д. 1**Hemoglobin: Modification, Crystallization, Polymerization (Review)**Viktoria A. Sergunova<sup>1</sup>, Ekaterina A. Manchenko<sup>1,2</sup>, Olga Ye. Gudkova<sup>1</sup><sup>1</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University,  
1 Universitetskaya Plaza, Moscow 119234, Russia

Цель обзора: привести наиболее значимые модификации и превращения молекулы гемоглобина, которые могут быть использованы для выработки стратегии реанимационных мероприятий и лечения жизненно опасных видов анемий.

Гемоглобин — один из наиболее хорошо изученных белков. В обзоре показана история исследования гемоглобина, начиная с 1839 г. по настоящее время. Приведены методы исследования гемоглобина: электрофорез, спектрофотометрический метод, метод рентгеноструктурного анализа, атомно-силовая микроскопия. Описаны основные формы гемоглобина: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, метгемоглобин, а также процессы кристаллизации и полимеризации этого белка. Многие формы гемоглобина обладают способностью к образованию кристаллов или полимеров *in vitro*, некоторые патологические формы могут модифицироваться *in vivo*. Исследование механизмов структурирования различных форм гемоглобина является актуальной и важной задачей фундаментальной науки.

**Ключевые слова:** оксигемоглобин; дезоксигемоглобин; метгемоглобин; гемоглобин S

The purpose of this review is to present the most significant modifications and transformations of a hemoglobin molecule potentially related to developing a strategy of resuscitation and treatment of life-threatening forms of anemia.

Hemoglobin is one of the well-studied proteins. The paper reviews the history of hemoglobin studies from 1839 until present. Methodically, the hemoglobin studies included electrophoresis, spectrophotometric method, X-ray diffraction method, atomic-force microscopy. The basic forms of hemoglobin include oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin and methemoglobin. Data on protein crystallization and polymerization are discussed. Many forms of hemoglobin have the ability to form crystals or polymers *in vitro*, some pathological forms can be modified *in vivo*. The studies of structural features of various hemoglobin forms represent a contemporary task for fundamental researches.

**Key words:** oxyhemoglobin; deoxyhemoglobin; methemoglobin; hemoglobin S

DOI:10.15360/1813-9779-2016-6-49-63

**Введение**

Гемоглобин — белок эритроцитов, красных кровяных клеток, переносящий молекулярный кислород от легких к тканям в организмах позвоночных животных [1, 2]. Структура, свойства и функции гемоглобина на протяжении последних 150 лет наиболее полно изучены по сравнению с

**Introduction**

Hemoglobin is a protein in erythrocytes, red blood cells, which carries molecular oxygen from lungs to tissues in the organisms of vertebrates [1, 2]. The structure, properties and functions of hemoglobin have been thoroughly studied over the last 150 years as compared to other proteins [3]. Linus

Адрес для корреспонденции:

Виктория Сергунова  
E-mail: orbf@mail.ru

Correspondence to:

Victoria Sergunova  
E-mail: orbf@mail.ru

другими белками [3]. Пионерами исследований гемоглобина являются Лайнус Полинг, Макс Перуц, Вернон Инграм, Карл Сингер и их последователи [4].

Нарушение структуры, модификации и свойств гемоглобина может приводить к осложнениям при кровопотере в постреанимационном периоде. Возникновение различных тяжелых форм анемии, например таких, как серповидноклеточная, гемолитическая анемии и другие, может приводить к летальному исходу [5]. Поэтому изучение структуры и свойств гемоглобина имеет важное значение в практической медицине и в реаниматологии.

Цель обзора — привести наиболее значимые модификации и превращения молекулы гемоглобина, которые могут быть использованы для выработки стратегии реанимационных мероприятий и лечения жизненно опасных видов анемий.

### История исследования гемоглобина

Впервые гемоглобин был обнаружен в 1839 году немецким исследователем Р. Хюнефельдом в крови обыкновенного дождевого червя [3]. Спустя 12 лет другой немецкий ученый О. Функ опубликовал серию статей, в которых он предложил метод получения устойчивых кристаллов гемоглобина или, как их тогда называли, кристаллов крови. Он исследовал кровь из селезенки лошади, собаки и разных рыб. В 1864 году известный немецкий физиолог Ф. Хоппе-Зайлер предложил название «гемоглобин». Клод Бернар показал, что гемоглобин в красных кровяных тельцах переносит кислород, и что  $O_2$  в гемоглобине может замещаться на монооксид углерода [6].

В 1909 году А. Хиллом была предложена первая модель связывания  $O_2$  с гемоглобином, описывающая экспериментальные данные. Согласно этой модели центры связывания  $O_2$  на молекулах гемоглобина не являются независимыми. А именно, присоединение одной молекулы  $O_2$  к одному из центров увеличивает сродство к  $O_2$  других центров, а связывание двух молекул  $O_2$  еще более облегчает связывание с третьей. Уравнение, описывающее процесс связывания  $O_2$  гемоглобином, называют уравнением Хилла [7].

В 1910 г. Херрик обнаружил серповидную форму эритроцитов [3, 8]. Решающую роль в биохимическом и генетическом анализе серповидноклеточной анемии сыграла работа выдающегося химика Л. Полинга [3, 8, 9]. В 1949 г. Лайнус Полинг выявил, что красные кровяные клетки больных этой болезнью становятся серповидными только в венозной крови, где низок уровень содержания кислорода. На основе знания химии гемоглобина Л. Полинг выдвинул предположение, что серповидная форма красных клеток вы-

Pauling, Max Perutz, Vernon Ingram, Karl Singer, and their followers were the first to study hemoglobin [4].

Impairment of hemoglobin structure, modification and properties can lead to complications of blood loss in the post-resuscitation period during resuscitation activities. Development of different forms of anemia, for example, sickle cell anemia, hemolytic anemia and others can lead to a lethal outcome [5]. Therefore, studies of hemoglobin structure and properties are important for practical medicine and reanimatology.

The purpose of this review is to discuss significant modifications and transformations of a hemoglobin molecule potentially related to developing a strategy of resuscitation and treatment of life-threatening forms of anemia.

### History of hemoglobin studies.

Hemoglobin was first discovered by a German researcher R. Hünefeld in the blood of ordinary earthworm in 1839 [3]. 12 years later, another German scientist O. Funk published a series of articles, where he proposed a method of production of stable crystals of hemoglobin, or blood crystals as they were called back then. He studied the blood from spleens of a horse, a dog, and different fishes. In 1864, a famous German physiologist F. Hoppe-Seyler supposed the term "hemoglobin". Claude Bernard showed, that hemoglobin in red blood cells carries oxygen, and that  $O_2$  in hemoglobin is replaced by carbon monoxide [6].

In 1909, the first model of  $O_2$  binding to hemoglobin was proposed by A. Hill; this model described the experimental data. According to this model, the sites of  $O_2$  binding on hemoglobin molecules are not independent. In particular, binding of one molecule of  $O_2$  to one of the sites increases the affinity to  $O_2$  of other sites, and binding of two  $O_2$  molecules further facilitates binding to the third. The equation describing the process of  $O_2$  binding to hemoglobin is called Hill equation [7].

In 1910, Herrick discovered the sickle shape of red blood cells [3, 8]. The work of a famous chemist Linus Pauling played a decisive role in the biochemical and genetic analysis of this illness [3, 8, 9]. In 1949, Linus Pauling learned that red blood cells of patients with sickle-cell anemia become sickle-shaped only in venous blood, where the level of oxygen is low. Based on his knowledge of hemoglobin chemistry, L. Pauling supposed that the sickle shape of red blood cells is caused by a genetic defect in the depth of cell hemoglobin. In 1952 he proved that normal hemoglobin and hemoglobin taken from patients with sickle-cell anemia can be separated by electrophoresis, a method used for division of different proteins in a mixture. The discovery confirmed

зывается генетическим дефектом клеточного гемоглобина. В 1952 г. он доказал, что нормальный гемоглобин и гемоглобин, взятый у больных серповидноклеточной анемией, можно различить с помощью электрофореза, метода разделения различных белков в смеси. Сделанное открытие подтвердило убеждение Л. Полинга в том, что причина аномалии кроется в белковой части молекулы гемоглобина [6, 8].

Точная структура гемоглобина стала известна главным образом благодаря работам английского биофизика Макса Перуца. Он впервые провел рентгеноструктурный анализ молекулы гемоглобина в конце 40-х годов XX века. За эти исследования в 1962 году он был удостоен Нобелевской премии [2, 3, 6, 7, 9].

### Структура гемоглобина и его модификации

Молекула гемоглобина состоит из четырех субъединиц и включает 574 аминокислоты. Каждая субъединица гемоглобина содержит одну небелковую группу — гем. Гем представляет собой протопорфирин, содержащий центрально расположенный ион двухвалентного железа ( $Fe^{2+}$ ) (рис. 1) [1, 2].

Существует несколько видов генов, кодирующих глобин — белковую часть гемоглобина. В самом деле, последовательность аминокислот гемоглобина немного отличается от одного человека к другому. Разные комбинации глобиновых цепочек формируют разные структуры гемоглобина.

Существуют физиологические и патологические виды гемоглобина. К физиологическим относят три основных типа гемоглобина: примитивный — HbR, фетальный — HbF, взрослый — HbA [6].

Помимо физиологических, выделяют более 200 форм патологических гемоглобинов, отличающихся друг от друга физико-химическими свойствами, в частности различной электрофоретической подвижностью и разным отношением к щелочам. Причиной возникновения патологических форм гемоглобина является повреждение генов, отвечающих за синтез той или иной цепи гемоглобина [6, 7].

Среди гемоглобинопатий наиболее известна серповидноклеточная анемия, связанная с таким нарушением строения белка гемоглобина, при котором он приобретает особое кристаллическое строение — так называемый гемоглобин S (HbS) [10–12]. Серповидноклеточная анемия является наследственным заболеванием, которое наиболее часто выявляется у людей африканского происхождения. HbS отличается от обычного HbA по своей электрофоретической подвижности и по аминокислотному составу, причем изменение

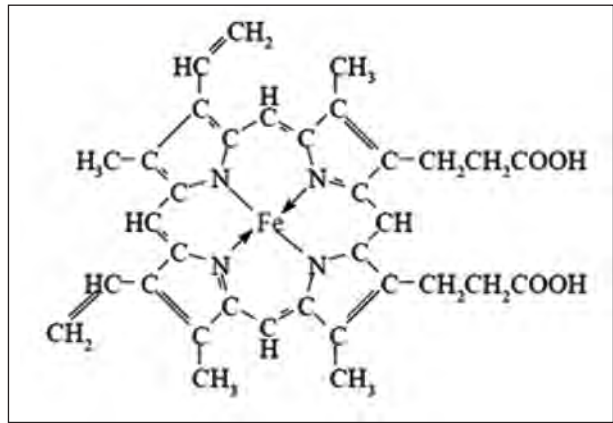


Рис. 1. Молекула гемоглобина.  
Fig. 1. A hemoglobin molecule.

L. Pauling's belief that the cause of the abnormality is in the protein part of the hemoglobin molecule [6, 8].

The exact structure of hemoglobin has become known mainly due to works of an English biophysicist Max Perutz. He was the first to perform an X-ray diffraction analysis of a hemoglobin molecule in late 1940s. In 1962, he was awarded the Nobel Prize for these studies [2, 3, 6, 7, 9].

### The structure of hemoglobin and its modifications

A hemoglobin molecule comprises of four subunits and includes 574 amino acids. Each subunit of hemoglobin contains one non-protein group called "heme". The heme is a protoporphyrin containing centrally located ion of ferrous iron  $Fe^{2+}$  [1, 2] (Fig. 1).

There are several types of genes encoding the globin, i.e. a protein part of hemoglobin. In fact, the amino acid sequence in hemoglobin slightly varies in different persons. Different combinations of the globin chains form different structures.

There are physiological and pathological forms of hemoglobin. Physiological ones include three main types of hemoglobin: a primitive (HbR), fetal (HbF), and adult (HbA) [6].

In addition to the physiological forms, there are more than 200 pathological forms of hemoglobin, which have different physical and chemical properties, in particular, different electrophoretic mobility and different relationship with alkalis. The pathological forms of hemoglobin are caused by damage of the genes responsible for the synthesis of a particular hemoglobin chain [6, 7].

The sickle-cell anemia is the most well-known hemoglobinopathy. It is associated with impairment of hemoglobin protein structure: it acquires a specific crystalline structure, a so-called hemoglobin S (HbS) [10–12]. The sickle-cell anemia is a hereditary disease, which is diagnosed most often in people of African descent. HbS differs from conventional HbA

аминокислотного состава касается только двух остатков глютаминовой кислоты примерно из 600 аминокислот, входящих в состав молекулы гемоглобина. У гемоглобина S на шестом месте вместо остатка глютаминовой кислоты находится электрически нейтральный валин. Такая замена повышает склонность молекул гемоглобина к полимеризации или кристаллизации [10, 13–15].

Для патологических форм гемоглобина характерно изменение структуры полипептидной цепи глобина, когда одна или несколько аминокислот заменены другими или отсутствуют.

У гемоглобина C на шестом месте вместо отрицательно заряженной глютаминовой кислоты находится положительно заряженный лизин [16]. Этот вариант гемоглобина назван «C» по названию города, у жителя которого была впервые обнаружена мутация — *Christchurch* (Новая Зеландия), хотя встречается преимущественно в Западной Африке. Эта мутантная форма снижает пластичность эритроцитов организма. HbC образует кристаллы внутри красных кровяных клеток. Образование кристаллов может привести к увеличению вязкости крови, к увеличению жесткости клеток, сокращению срока жизни эритроцитов. Присутствие гемоглобина C в крови человека может спровоцировать такое заболевание, как хроническая гемолитическая анемия [17–21].

Гемоглобин E (HbE) возникает, когда на 26 месте глютаминовая кислота заменена на лизин. Этот мутационный тип гемоглобина наиболее часто встречается у коренного населения Юго-Восточной Азии.

В тех случаях, когда присутствует комбинация гемоглобинов C и S, у человека могут возникнуть более тяжелые формы анемии.

### Методы исследования

Одним из широко распространенных методов, позволяющих выявить патологические формы гемоглобинов, является электрофоретический метод [16].

Электрофорез — электрокинетическое явление перемещения частиц дисперсной фазы (например, белковых растворов) в жидкой среде под действием внешнего электрического поля. При определенном значении pH и ионной силы раствора белки движутся в электрическом поле со скоростью, зависящей от молекулярной массы и суммарного заряда. Белки, имеющие суммарный отрицательный заряд, движутся к аноду, а положительно заряженные белки — к катоду [7].

Электрофоретическая подвижность  $U$  определяется формулой:

$$U = \nu / E,$$

где  $\nu$  — скорость движения молекулы [см/с];  $E$  — напряженность электрического поля [В/см].

гемоглобин в its electrophoretic mobility and amino acid composition; at that, changes in the amino acid composition are related only to two glutamic acid residues of approximately 600 amino acids in the hemoglobin molecule. In hemoglobin S, electrically neutral valine is situated in the sixth place instead of the glutamic acid residue. This replacement increases the predisposition of hemoglobin molecules to polymerization or crystallization [10, 13–15].

Changes in the structure of globin polypeptide chain are typical for the pathological types of hemoglobin; at that, one or more amino acids are replaced by others or absent.

In hemoglobin C, there is a positively charged lysine in the sixth place instead of negatively charged glutamic acid [16]. This variant of hemoglobin was called "C" after the name of the city, whose resident had the first discovered mutation, Christchurch (New Zealand), but this variant occurs mainly in West Africa. This mutant form reduces the plasticity of the body red blood cells. HbC forms crystals inside red blood cells. Crystal formation may cause increased blood viscosity, increased cell rigidity, and shortens the life span of RBCs. The presence of hemoglobin C in human blood can cause such disease as chronic hemolytic anemia. [17–21].

Hemoglobin E (HbE) occurs when glutamic acid is replaced with lysine in the 26<sup>th</sup> place. This type of hemoglobin mutation is most common in indigenous population of Southeast Asia.

In the event of a combination of hemoglobin C and S, there may be more severe forms of anemia.

### Methods

Electrophoresis is one of the most common methods, which permit detecting pathological forms of hemoglobin [16].

Electrophoresis is an electrokinetic phenomenon of movement of particles of the dispersed phase (e. g., protein solutions) in a liquid medium under the effect of an external electric field. At a certain pH value and ionic strength of the solution, proteins move in an electric field at a rate depending on the molecular weight and total charge. Proteins with a total negative charge move toward the anode and positively charged proteins to the cathode [7].

The electrophoretic mobility  $U$  is calculated using the following equation:

$$U = \nu / E, \text{ where}$$

$\nu$  is the molecule motion speed [cm/s];  $E$  is the intensity of the electric field [V/cm]

There are many variations and modifications of this method, which are carried out on a variety of media: paper, starch gel, polyacrylamide gel (PAGE), etc. Each of these methods is characterized by different resolution abilities. For example, in electrophoresis of human serum proteins on paper, only 5 main fractions are deter-



Существует множество разновидностей и модификаций данного метода, которые проводят на различных носителях: бумаге, крахмальном геле, полиакриламидном геле (ПААГ) и др. Каждый из методов характеризуется различной разрешающей способностью. Например, при электрофорезе белков сыворотки крови человека на бумаге обнаруживают только 5 главных фракций, а для тех же белков в ПААГ возможно разрешить до 18 различных фракций. Для обнаружения белковых фракций полоски бумаги или столбики геля обрабатывают красителем. Окрашенный комплекс белков с красителем выявляет расположение различных фракций на носителе.

Электрофоретический метод применяется в молекулярной биологии для разделения макромолекул, а также их фрагментов, используется в клинической диагностике, популяционной биологии (для изучения генетической изменчивости) и др.

Для изучения состава различных соединений применяют спектрофотометрический метод, который заключается в изучении спектров поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Он основан на измерении ослабления света и расчете концентрации поглощающего материала по найденной оптической плотности раствора в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 e^{-k_\lambda C x}, \quad (1)$$

где  $x$  — слой, который прошла частица в веществе в направлении оси  $X$ ;  $k_\lambda$  — удельный показатель поглощения, зависящий от природы вещества и длины волны излучения;  $C$  — концентрация вещества [16]. Зарегистрировав  $I_0$  на входе и  $I$  на выходе, можно определить коэффициент пропускания  $\tau$  и оптическую плотность  $D$ , которые связаны соотношением:

$$\tau = I/I_0, \quad D = \lg(1/\tau) = \mathcal{E} C x, \quad (2)$$

где  $\mathcal{E}(\tau)$  — молярный показатель поглощения, то есть оптическая плотность вещества слоем 1 см при  $C = 1$  ммоль/л, зависит от вида вещества и длины волны.

На рисунке 2 представлен стандартный спектр оксигемоглобина. Оптическая плотность раствора гемоглобина представлена на длинах волн 500–650 нм [22], где  $\lambda$  — это длина волны,  $D$  — оптическая плотность раствора.

Наиболее информативным методом в исследовании белков и гемоглобина, в частности, является метод рентгеноструктурного анализа [23]. Целью данного метода является установление пространственной структуры белка, т. е. опреде-

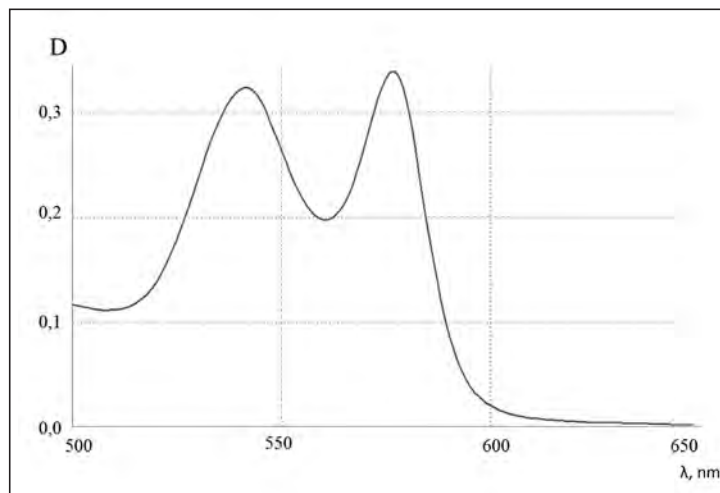


Рис. 2. Спектр поглощения гемоглобина.  
Fig. 2. Hemoglobin absorption spectrum.

минировать; и в том же белке в PAGE, до 18 различных фракций может быть найдено. Бумажные полоски или гелевые столбики обрабатывают красителем для обнаружения белковых фракций. Окрашенный белок+краситель комплекс демонстрирует местоположение различных фракций на носителе.

Электрофоретический метод используется в молекулярной биологии для разделения макромолекул и их фрагментов; он также используется в клинической диагностике, популяционной биологии (для оценки генетической изменчивости), и др.

Для изучения структуры различных соединений, а спектрофотометрический метод используется. Он изучает спектры поглощения в ультрафиолетовой (200–400 нм), видимой (400–760 нм) и инфракрасной (>760 нм) областях спектра. Он основан на измерениях ослабления света и расчетах концентрации поглощающего материала на основе полученной оптической плотности раствора в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бугера:

$$I = I_0 e^{-k_\lambda C x}, \quad (1)$$

где  $x$  — слой, который прошла частица в веществе в направлении оси  $X$ ,  $k_\lambda$  — удельный коэффициент поглощения, который зависит от природы вещества и длины волны излучения,  $C$  — концентрация вещества [16]. После регистрации  $I_0$  на входе и  $I$  на выходе, можно определить коэффициент пропускания  $\tau$  и оптическую плотность  $D$ , которые выражены следующими уравнениями:

$$\tau = I/I_0, \quad D = \lg(1/\tau) = \mathcal{E} C x, \quad (2)$$

где  $\mathcal{E}(\tau)$  — молярный коэффициент поглощения, т. е. оптическая плотность 1 см слоя вещества с  $C = 1$  ммоль/л, зависит от типа вещества и длины волны.

Рисунок 2 показывает стандартный спектр оксигемоглобина. Оптическая плотность раствора гемоглобина показана на длинах волн 500–650 нм [22], где  $\lambda$  — это длина волны, а  $D$  — оптическая плотность раствора.

ление расположения атомов в трехмерном пространстве молекулы. Это достигается использованием дифракции рентгеновских лучей на кристаллической структуре белка. Дифракционная карта позволяет получить распределение электронной плотности  $\rho(\mathbf{r})$  в кристалле и вычислить программными методами пространственную структуру гемоглобина [24].

Рассеяние на кристаллической структуре описывает формула Вульфа-Бреггов:

$$2d \sin \Theta = k\lambda \quad (3)$$

где  $\lambda$  — длина волны излучения,  $d$  — период кристаллической решетки,  $\Theta$  — угол скольжения,  $k$  — порядок максимума. Этот метод позволяет получить дифракционные рефлексы различных белков, в том числе гемоглобина. Затем по виду  $n$ -го количества дифракционных картин восстанавливается объемная структура изучаемой молекулы. Именно таким методом были получены структура гемоглобина и его модификаций [28, 29].

Наряду с рентгеновской кристаллографией для исследования строения белковых молекул использовался метод электронной микроскопии, который реализуется с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ).

В нем реализуются квантово-волновые свойства электронов:

$$\lambda_B = h/mv \quad (4),$$

где  $\lambda_B$  — длина волны Де Бройля,  $h$  — постоянная планка,  $m$  и  $v$  — масса и скорость электрона.

В СЭМ поверхность образца сканируется пучком электронов с первичной энергией около 10 кэВ. Облучаемая при таком сканировании поверхность начинает излучать либо так называемые вторичные электроны, либо кванты света, которые регистрируются, усиливаются, преобразуются по интенсивности, после чего подаются на экран электронно-лучевой трубки, создавая видимое изображение поверхности [14].

В настоящее время наноструктуру и свойства гемоглобина изучают с помощью сканирующей зондовой микроскопии, в частности, атомной силовой микроскопии [30].

Основной принцип работы атомно-силового микроскопа (АСМ) заключается в силовом взаимодействии тонкой сканирующей иглы (зонда) с поверхностью образца (рис. 3) [31, 32]. Энергия взаимодействия  $U$  молекул (атомов) образца с иглой зонда определяется потенциалом Ленарда-Джонса:

$$U(\mathbf{r}) = U_0 \left[ \left( \frac{R_0}{r} \right)^{12} - \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \right] \quad (5),$$

где  $r$  — расстояние между иглой и образцом,  $R_0$  — характерное расстояние между иглой и образцом, при котором  $U(r)=0$ .

Сила Ван-дер-Ваальса, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Зарегистрировав величину изгиба, можно сделать вывод о трехмерном рельефе исследуе-

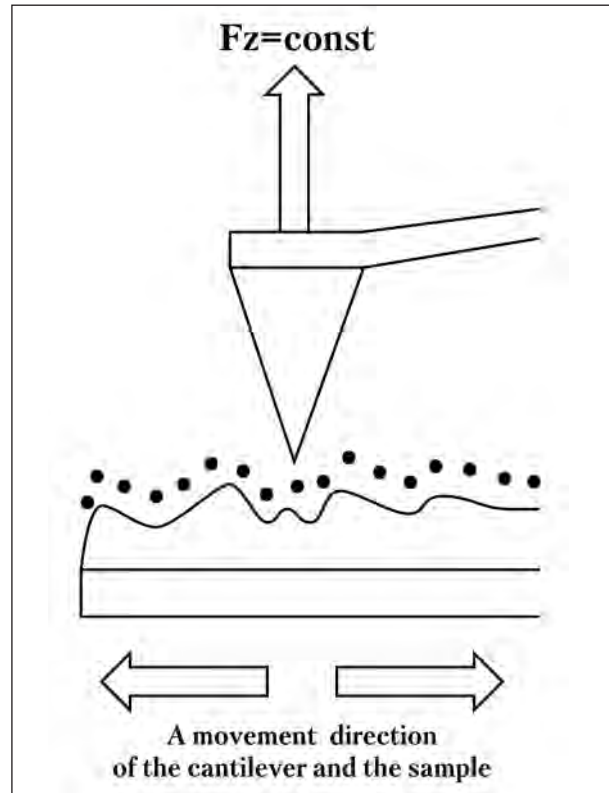


Рис. 3. Принцип работы атомного силового микроскопа АСМ NTEGRA Prima [33–38].

Fig. 3. The operating principle of the atomic force microscope AFM NTEGRA Prima [33–38].

Note.  $F_z$  — the force acting on the sample when is piezoscanning.

Примечание.  $F_z$  — сила, действующая на образец при пьезосканировании. A movement direction of the cantilever and the sample — направление движения кантилевера и образца.

X-ray diffraction analysis is the most informative method for testing of proteins and hemoglobin, in particular [23]. The aim of this method is to establish the spatial structure of the protein, i.e. to determine the location of atoms in a three-dimensional space of the molecule. It is achieved by using X-ray diffraction on the crystal structure of the protein. Diffraction map allows to obtain the electron density distribution  $\rho(\mathbf{r})$  in a crystal and to compute the spatial structure of hemoglobin [24].

Scattering in the crystal structure is described by the Bragg's law:

$$2d \sin \Theta = k\lambda \quad (3)$$

where  $\lambda$  is the wavelength,  $d$  is the crystal lattice period,  $\Theta$  is the slip angle,  $k$  is the grating order. This method allows to obtain diffraction reflexes of different proteins, including hemoglobin. Then, based on  $n$  diffraction pattern, a three-dimensional structure of the molecule is restored.

The structure of hemoglobin and its modifications have been obtained using this method [28, 29].

In addition to the X-ray crystallography, a method of electron microscopy is used for studies of

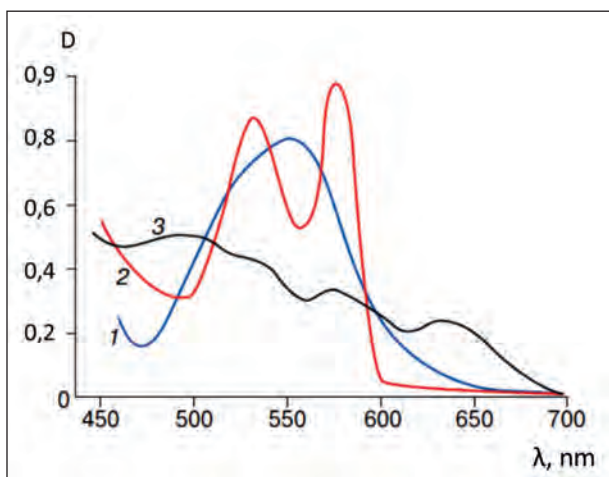


Рис. 4 Спектры поглощения дезоксигемоглобина (1), оксигемоглобина (2) и метгемоглобина (3) [2].

Fig. 4. Absorption spectra of deoxyhemoglobin (1), oxyhemoglobin (2) and methemoglobin (3) [2].

мой поверхности. Кроме этого АСМ позволяет производить измерения в воздушной атмосфере, в жидкости, в вакууме, что открывает широкие возможности для изучения биомолекул.

### Основные формы гемоглобина

Гемоглобин при нормальном функционировании организма может находиться в одной из 3-х форм: дезоксигемоглобин, оксигемоглобин и метгемоглобин. В дезоксигемоглобине железо находится в закисной форме — Fe(II), в которой глобин предохраняет железо гема от окисления. Оксигемоглобин — это результат соединения гемоглобина с молекулярным кислородом, при котором перенос электрона на кислород происходит не от железа, а от имидазольного кольца проксимального гистидина. Взаимодействие молекулярного кислорода со свободным гемом приводит к необратимому окислению атома железа гема, при котором Fe(II) переходит в Fe(III), то есть образуется метгемоглобин. На рисунке 4 показаны спектры поглощения основных форм гемоглобина.

Действие различных токсинов приводит к модификации гемоглобина. Например, под воздействием  $\text{NaNO}_2$  оксигемоглобин переходит в форму метгемоглобина [22]. Изменение спектра поглощения гемоглобина отражает это воздействие (рис. 5).

На рисунке 6 схематически показаны электронная структура железа гема, положение атома железа относительно полосы порфиринового

protein molecule structure. For this purpose, a scanning electron microscope (SEM) is used.

It realized the quantum-wave properties of electrons:

$$\lambda_B = h/mv \quad (4),$$

where  $\lambda_B$  is the de Broglie wavelength,  $h$  is the Planck constant,  $m$  и  $v$  are the weight and velocity of an electron, respectively.

In SEM, the sample surface is scanned by a beam of electrons with a primary energy of about 10 keV. The radiated surface begins to radiate either so-called secondary electrons, or light quanta which are registered, amplified, converted in intensity, and then sent to a cathode ray tube screen, creating a visible image of the surface [14].

At present, the nanostructure and properties of hemoglobin are studied using a scanning probe microscopy, in particular, atomic force microscopy [30].

The basic principle of action of atomic force microscope (AFM) is the force interaction between a fine scanning needle (probe) and the surface of the sample (Fig. 3) [31, 32]. The energy of interaction  $U$  molecules (atoms) of the sample with the probe needle is determined by the Lennard-Jones potential:

$$U(r) = U_0 [(R_0/r)^{12} - (R_0/r)^6] \quad (5),$$

where  $r$  is the distance between the needle and the sample,  $R_0$  is a typical distance between the needle and the sample at which  $U(r)=0$ .

Van der Waals forces acting on the probe from the surface results in bending of the console. Registration of the degree of bending permits to conclude on a three-dimensional pattern of the surface investigated. In addition, AFM allows to perform measurements in atmospheric air, in a liquid, and in vacuum, and it opens great opportunities for studies of biomolecules.

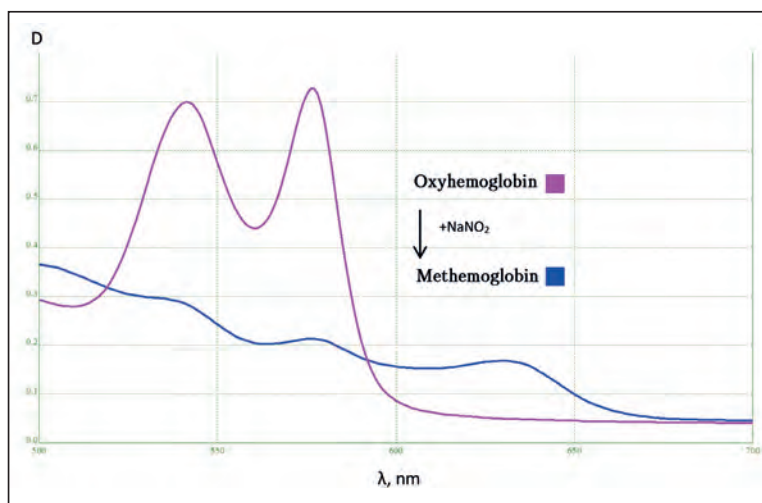


Рис. 5. Изменение спектра поглощения оксигемоглобина после воздействия  $\text{NaNO}_2$ .

Fig. 5. The change of oxyhemoglobin absorption spectrum after exposure of  $\text{NaNO}_2$ .

кольца гема, спектральные и магнитные характеристики молекул в различных состояниях молекулы гемоглобина: дезоксигемоглобин, оксигемоглобин и метгемоглобин. Переход из одного состояния в другое требует значительного времени, в течение которого система проходит через несколько неравновесных состояний, заметно отличающихся по своим физическим и химическим свойствам от равновесных состояний.

В молекуле дезоксигемоглобина железо не находится в плоскости порфиринового кольца. Из шести 3d-электронов железа Fe(II) два электрона спарены на одной из низших d-орбиталей, их спиновые моменты  $S=2$ . Магнитный момент гема в этом состоянии равен  $\sim 5,5$  борновского магнетона (БМ), а спектр поглощения в зеленой области имеет характерную полосу с  $\lambda_{\max} \sim 556$  нм. Присоединение кислорода ведет к значительным изменениям. Атом железа в оксигемоглобине лежит практически в плоскости порфиринового кольца. Все шесть d-электронов спарены на трех низших уровнях d-орбиталей,  $S=0$ , оксигемоглобин диамагнитен. В зеленой области спектра имеются две характерные полосы поглощения: а ( $\lambda_{\max} \sim 576 \text{ \AA}$ ) и б ( $\lambda_{\max} \sim 542 \text{ \AA}$ ).

В метгемоглобине при нейтральных значениях pH место кислорода занимает молекула воды, железо находится значительно ближе к плоскости гема, чем в дезоксигемоглобине, все 5 d-электронов не спарены и занимают пять d-орбиталей.  $S=5/2$  и магнитный момент равен 5,91 БМ [2].

Структурные изменения в активном центре приводят к значительным изменениям пространственной структуры всего белка. При оксигенации смещения отдельных аминокислотных остатков достигает  $7 \text{ \AA}$ . Четвертичная структура гемоглобина характеризуется наличием четырех полипептидных цепей, образующих две  $\alpha$  и две  $\beta$ -субъединицы. Переход от Т к R форме сопровождается поворотом одного димера относительно другого на  $12\text{--}15^\circ$  и в конечном счете приводит к увеличению «карманов», в которых находятся гемы. Эти структурные изменения инициируются присоединением первой молекулы  $O_2$  к одному из свободных гемов и распространяется на всю глобулу. Именно поэтому в равновесной смеси всегда присутствуют только Т и R формы [2].

### Кристаллизация и полимеризация белков

Многие формы гемоглобина обладают способностью к образованию кристаллов или полимеров *in vitro*, некоторые патологические формы могут модифицироваться *in vivo* [39].

Однако в ряде статей отсутствуют четкие разграничения между кристаллизацией и полимеризацией гемоглобина [40]. Необходимо различать эти понятия.

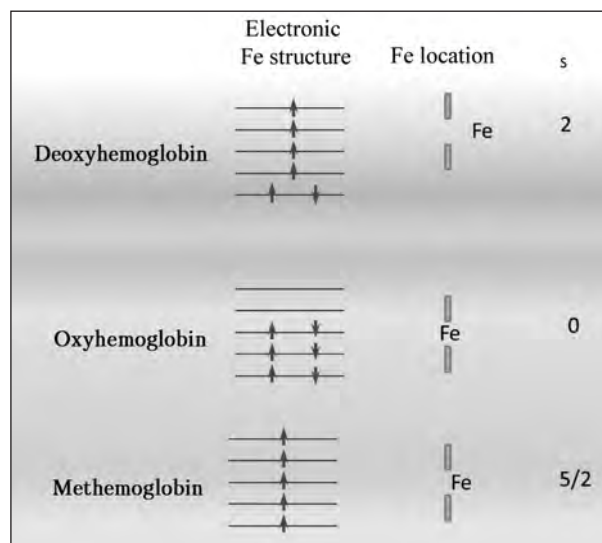


Рис. 6. Основные характеристики гемоглобина в различных состояниях.

Fig. 6. Basic characteristics of hemoglobin at various states.

### The main forms of hemoglobin.

Hemoglobin with normal functions can exist in one of following three forms: deoxyhemoglobin, oxyhemoglobin and methemoglobin. In deoxyhemoglobin, iron exists in the form of iron protoxide Fe (II), and globin protects the heme iron from oxidation. Oxyhemoglobin is a compound of hemoglobin with molecular oxygen, in which electron transfer to oxygen occurs not from iron, but from the imidazole ring of proximal histidine. Interaction of molecular oxygen with free heme leads to irreversible oxidation of a Fe (II) iron atom in heme to Fe (III), i.e. methemoglobin is formed. Figure 4 demonstrates their spectra.

The effect of different toxins, such as  $\text{NaNO}_2$  modifies the hemoglobin spectrum [22]. This is shown in Figure 5.

Figure 6 shows a schematic depiction of an electronic structure of heme iron, the iron atom position in relation to the strips of the porphyrin ring of heme, spectral and magnetic characteristics of molecules at different states of hemoglobin molecules: deoxyhemoglobin, oxyhemoglobin and methemoglobin. To transition from one state to another requires a significant amount of time during which the system goes through several nonequilibrium states which physical and chemical properties differed from those of the equilibrium states.

In a molecule of deoxyhemoglobin, iron is located outside the plane of the porphyrin ring. Of six 3d electrons of Fe (II) iron, two electrons are coupled on one of lowest d orbitals, and their spin moments are  $S=2$ . The magnetic moment of heme at this state is  $\sim 5.5$  Bohr magneton ( $\mu_B$ ), and the absorption spectrum in the green area has a typical band with  $\lambda_{\max} \sim 556$  nm. Addition of oxygen leads



Кристаллизация — это фазовый переход вещества из жидкого состояния в твердое кристаллическое с образованием кристаллов.

Полимеризация — это процесс образования высокомолекулярного соединения путем многократного присоединения молекул низкомолекулярного вещества (мономера, олигомера) к активным центрам в растущей молекуле полимера.

Чтобы началась кристаллизация, необходимо создать такие условия, в которых белковый раствор становится перенасыщенным, что приводит к белок-белковой агрегации. Для этой цели используют осадители (вещества, уменьшающие растворимость): сульфат аммония, полиэтиленгликоль (ПЭГ), органические растворители. Обычно требуется тщательное изучение условий кристаллизации конкретного белка: pH, концентрации буфера и осадителя, ионов металлов [41–43].

Белки принципиально отличаются от хорошо изученных легко растворимых, низкомолекулярных кристаллов. Во-первых, белки имеют большой размер молекул (следовательно, большой размер строительных единиц). Во-вторых, их молекулы гидратированы, то есть имеют водную оболочку, препятствующую их сближению в растворе, поэтому кристаллизация возможна только в присутствии низкомолекулярных солей, разрывающих оболочку. В-третьих, форма белковых молекул весьма сложна, им нужно дополнительное время для изменения конформации, чтобы выстроиться в кристаллическую решетку [43].

Скорость роста кристаллов зависит от растворимости белка, т. е. от концентрации растворителя. Иногда чтобы вырастить большие кристаллы, в раствор белка вносят затравку — мелкие кристаллы этого белка. Кристалл белка может храниться полгода в специальном растворе, который не содержит белка. Подбирается такая концентрация осадителя, при которой кристалл не растворялся бы и не трескался [41].

Гемоглобин человека кристаллизуется с трудом, так как он очень хорошо растворим и обычно не осаждается при удалении соли, как это удается сделать в случае гемоглобина лошади [24]. Поэтому для кристаллизации гемоглобина в качестве осадителя чаще всего используют соли с добавлением ПЭГ. В результате получают плоские кристаллы различной формы в зависимости от вида гемоглобина.

В настоящее время для кристаллизации гемоглобина человека из концентрированных растворов фосфатов или сульфата аммония различными исследователями предложен ряд методов, сходных между собой в том отношении, что все они основаны на использовании явления высаливания [42]. Гемоглобин быка, так же как и гемоглобин человека, очень хорошо растворим и может быть выделен в кристаллическом состоянии,

to significant changes. The iron atom in oxyhemoglobin lies almost in the plane of the porphyrin ring. All six d-electrons are coupled at three lowest levels of d-orbitals,  $S=0$ ; the oxyhemoglobin is diamagnetic. Two typical absorption bands are seen in the green part of the spectrum: a ( $\lambda_{\max} \sim 576\text{\AA}$ ) and b ( $\lambda_{\max} \sim 542\text{\AA}$ ).

In methemoglobin, a water molecule replaces oxygen at neutral pH values; iron is much closer to the plane of the heme, than in deoxyhemoglobin, all 5 d-electrons are not coupled and occupy five d-orbitals.  $S = 5/2$  and the magnetic moment is  $5.91 \mu\text{B}$  [2].

Structural changes at the active site lead to significant changes in the spatial structure of the whole protein. Displacement of individual amino acid residues reaches  $7\text{\AA}$  during oxygenation. The quaternary structure of hemoglobin is characterized by the presence of four polypeptide chains forming two  $\alpha$  and two  $\beta$  -subunits. Transition from T to R form is associated with rotation of one dimer relative to the other by  $12\text{--}150$  and ultimately leads to an increase in the pockets, where hemes are located. These structural changes are initiated by attachment of the first  $\text{O}_2$  molecule to one of the free hemes and spreads to the whole globule. That is why only T and R forms are present at the equilibrium state [2].

### Crystallization and polymerization of proteins

Many forms of hemoglobin have the ability to form crystals or polymers *in vitro*, some pathological forms can be modified *in vivo* [39].

However, a number of articles do not differentiate between crystallization and polymerization of hemoglobin [40]. However, these terms should be differentiated.

Crystallization is a phase transition from liquid to solid crystalline with the formation of crystals.

Polymerization is a process of formation of high molecular weight compounds by repeated attachment of molecules of low molecular weight substances (monomers, oligomers) to active sites in a growing polymer molecule.

To begin the crystallization, there should be conditions under which the protein solution becomes supersaturated, thus leading to protein-protein aggregation. For this purpose, precipitators are used (substances that reduce the solubility): ammonium sulfate, polyethylene glycol (PEG), organic solvents. A thorough study of the crystallization conditions for a specific protein is usually required: pH, buffer and precipitant concentrations, metal ion concentrations [41–43].

Proteins are fundamentally different from well-studied, easily soluble, low-molecular crystals. First, the proteins have large molecules (and therefore large construction units). Second, their molecules



Рис. 7. Эритроцит серповидной формы [45].  
Fig. 7. Red blood cells: sickle-shaped cell [45].

как этими методами, так и осаждением из водного раствора этиловым спиртом [24, 41]. Раствор гемоглобина обрабатывают небольшим количеством спирта для понижения растворимости и оставляют на 2–3 недели при 0°C.

Считается, что серповидноклеточная анемия — это результат кристаллизации гемоглобина. Серповидноклеточная анемия — наследственное заболевание системы крови, характеризующееся генетическим дефектом, в результате которого нарушается образование нормальных цепей гемоглобина в эритроцитах. Образующийся при этом аномальный гемоглобин отличается по своим электрофизиологическим свойствам от гемоглобина здорового человека, в результате чего изменяются и сами эритроциты, приобретая удлиненную форму, под микроскопом напоминающую серп (рис. 7). Серповидные эритроциты быстро разрушаются в организме, а также закупоривают множество сосудов по всему организму, что может стать причиной тяжелых осложнений и даже смерти.

Проницаемость мембраны серповидных клеток для различных ионов повышена, что приводит к необратимым изменениям формы эритроцитов.

Пластические способности серповидного эритроцита значительно снижены, он не способен обратимо деформироваться при прохождении через капилляры, и может закупоривать их. Мембрана серповидных эритроцитов отличается повышенной ломкостью, в результате чего продолжительность их

are hydrated, i.e. have an aquatic shell which prevents their approaching in a solution, therefore, the crystallization is possible only in the presence of low-molecular salts, which can disrupt the shell. Third, the shape of protein molecules is very complicated; they need additional time to change the conformation, in order to line up in the crystal lattice [43].

Crystal growth rate depends on the solubility of the protein, i.e. on the solvent concentration. Sometimes, seed is introduced in the protein solution (i.e. small crystals of this protein) in order to form large crystals. A protein crystal can be stored for six months in a special protein-free solution. The precipitant concentration is selected so that the crystal would not be dissolved or cracked [41].

Human hemoglobin crystallizes with difficulty, because it is very soluble and is not usually precipitated after salt removal, as it is possible to do with horse hemoglobin [24]. Therefore, salts with PEG are usually used as precipitants for crystallization of hemoglobin. As a result, flat crystals of various shapes are formed, depending on the type of hemoglobin.

At present, different researchers proposed a number of similar methods to crystallization of human hemoglobin from concentrated solutions of phosphates or ammonium sulfate; all of them are based on the salting out phenomenon [42]. Bovine hemoglobin, as well as human hemoglobin, is very soluble and may be isolated in the crystalline state both by these methods and precipitation from an aqueous using ethanol [24, 41]. A hemoglobin solution is treated with small amounts of alcohol in order to reduce the solubility and is allowed to stand for 2–3 weeks at 0°C.

It is believed that sickle cell anemia is the result of crystallization of hemoglobin. Sickle cell anemia is an inherited disease of the blood system, characterized by a genetic defect, which resulted in impaired formation of normal chains of hemoglobin in RBCs. Properties of abnormal hemoglobin formed as a result of this process differ from those of healthy person's hemoglobin. As a result, red blood cells also change getting an oblong shape resembling a sickle under a microscope (Fig. 7). Sickle-shaped red blood cells break down quickly in the body and occlude many blood vessels throughout the body, and it may cause severe complications and even death.

The membrane permeability for different ions is increased in sickle cells, thus leading to irreversible changes in the shape of red blood cells.

Plastic properties of a sickle cell are significantly reduced; it is not capable of deforming reversibly when passing through capillaries and can occlude them. The sickle cell membrane is very fragile, therefore its life span is shortened considerably. The decrease in the total RBC count stimulates the production of erythropoietin in the kidneys. It enhances erythropoiesis in the red bone marrow and may par-

жизни значительно укорачивается. Уменьшение общего количества эритроцитов в крови, стимулирует образование эритропоэтина в почках. Это усиливает эритропоэз в красном костном мозге и может частично или полностью компенсировать проявления анемии. На сегодняшний день серповидноклеточная анемия неизлечима [4, 5].

Полимеризацию гемоглобина используют в производстве кровезаменителей. Полимеризация гемоглобина *in vitro* происходит с помощью различных агентов: глутарового альдегида, полиэтиленгликоля, декстрана, гидроксиэтилкрахмала [14–16]. Полимеризация гемоглобина (рис. 8) происходит одинаково в растворах и в клетках. Формирование волокон из молекул гемоглобина возможно только для дезоксигемоглобина. Формирование волокна проходит 2 основных этапа. На 1-м этапе примерно семь молекул гемоглобина должны собраться вместе, чтобы сформировать ядро, которое будет точкой отсчета для будущего волокна.

Патологические формы гемоглобина могут полимеризоваться в эритроците, то есть молекулы гемоглобина слипаются и образуют длинные волокна или стержни [15, 39]. Например, цепь  $\beta_2$  соединяется с  $\beta_1$  и этот процесс относительно медленно повторяется, формируя основу для будущей нити (на рис. 8 показано стрелкой). После того, как образуется ядро, начинается 2-й этап процесса. На этой 2-й стадии волокна формируются относительно быстро, потому что молекулы присоединяются к уже существующей структуре.

Коагуляция гемоглобина или гемоглибиновая дегенерация Эрлиха — это неравномерное распределение в эритроцитах гемоглобина как результат процессов, ведущий к коагуляции гемоглобина. При выраженной коагуляции гемоглобина внутри клетки фон эритроцита становится более светлым. Коагуляцию гемоглобина может вызвать высокая концентрация ионов тяжелых металлов, например цинка. На рисунке 9 показаны изображения фрагментов коагуляции гемоглобина, которые были получены с помощью атомно-силовой микроскопии. Фрагменты гемоглибиновых коагулянтов включают в себя отдельные зерна (рис. 9, а), чьи размеры варьируют от 20 до 70 нм. После 30 минут воздействия раствором цинка (рис. 9, б) зерна объединились и их размер увеличился [46].

Значительный вклад в изучение кристаллических особенностей гемоглибинов внес Г. Драбкин [47]. Изучив кристаллографические свойства оксигемоглибинов человека, лошади, собаки, автор пришел к выводу, что форма кристаллов значи-

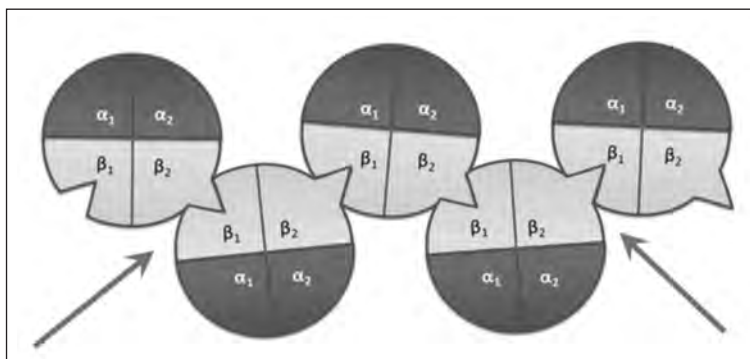


Рис. 8. Полимеризация гемоглобина.

Fig. 8. Hemoglobin polymerization.

Note. Arrows show the connection of  $\beta_2$  and  $\beta_1$  chains in hemoglobin molecules.

Примечание. Стрелки показывают соединение  $\beta_2$  и  $\beta_1$  цепей молекул гемоглобина.

tially or completely compensate manifestations of anemia. To date, sickle cell anemia is incurable [4, 5].

Polymerization of hemoglobin is used in the manufacture of blood substitutes. Hemoglobin *in vitro* polymerization occurs via various agents: glutaraldehyde, polyethylene glycol, dextran, hydroxyethyl starch [14–16]. Polymerization of hemoglobin (Fig. 8) does not differ in solutions and in cells. Formation of fibers from hemoglobin is possible for deoxyhemoglobin alone. Fiber formation occurs in two main phases. At the first stage, about seven hemoglobin molecules should be gathered together to form a nucleus, which is the starting point for the future fiber.

Pathological hemoglobin forms can polymerize in a RBC, i.e. hemoglobin molecules stick together and form long fibers or rods [15, 39]. For example,  $\beta_2$  chain connects with  $\beta_1$ , and this process is repeated to form a fiber. An arrow in Fig. 6 points to this process. It occurs relatively slowly. Once the nucleus is formed, the second phase of the process begins. At this second stage, fibers are formed relatively quickly because the molecules are attached to the existing structure.

Coagulation of hemoglobin or Erlich hemoglobin degeneration is a heterogeneous distribution of hemoglobin in RBCs as a result of processes leading to the hemoglobin coagulation. Red blood cell background becomes lighter in case of marked hemoglobin coagulation inside a cell. The hemoglobin coagulation can be caused by a high concentration of ions of heavy metals, such as zinc. Figure 9 shows images of fragments of the hemoglobin coagulation, which were obtained using the atomic force microscopy. Fragments of hemoglobin coagulants include individual grain (Fig. 9, a), whose sizes range from 20 to 70 nm. The grains merged and their size increased within 30 minutes of exposure to zinc solution (Fig. 9, b) [46].

G. Drabkin made a significant contribution to the study of the crystalline characteristics of hemoglo-



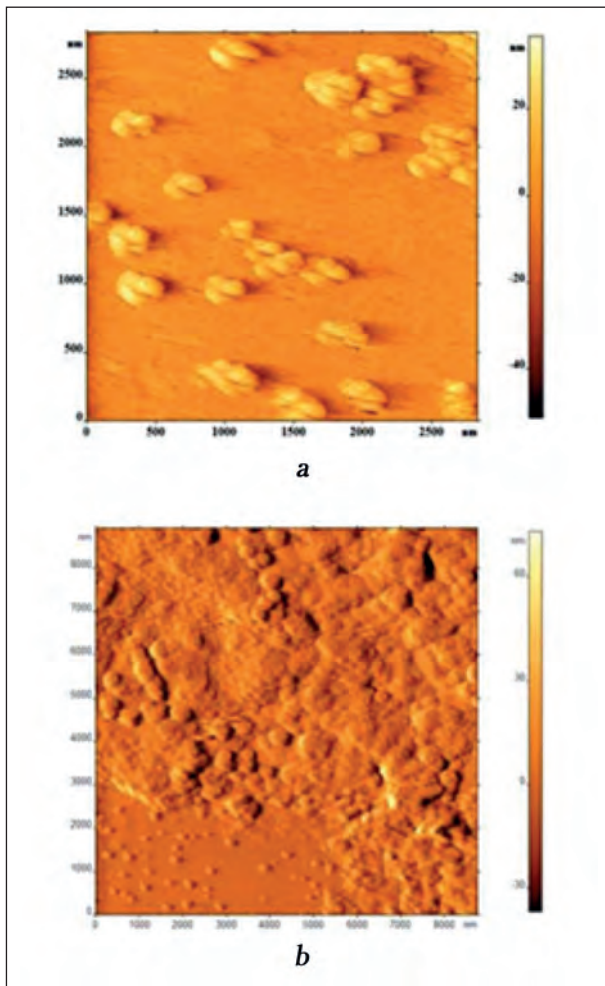


Рис. 9. АСМ-изображения коагуляции гемоглобина.

Fig. 9. AFM images of the hemoglobin coagulation.

Note. *a* – 30 min; *b* – 90 min after addition of Zn ( $C = 6$  mM) to the hemoglobin solution.

Примечание. *a* – 30 мин; *b* – 90 мин после добавления Zn ( $C=6$  мМ) в раствор гемоглобина.

тельно варьирует от вида к виду [44]. Им же было показано, что гемоглобин кристаллизуется в трех формах: моноклинной, ромбической и гексагональной. Видовая специфичность кристаллических форм гемоглобинов подтверждается работами Б. Сухомлинова, Д. Дворниковой и другими [48].

Ряд авторов отмечают, что кристаллы окси- и дезоксигемоглобина отличаются своей формой. Например, Р. Хирш в своей статье показывает, что оксигемоглобин С может образовывать тетрагональные кристаллы, а дезоксигемоглобин С – плоские [40]. Р. Наджел отмечает, что тетрагональные кристаллы оксигемоглобина С могут образовываться как *in vitro*, так и *in vivo* [39].

По мнению Кендрью большое влияние на форму кристаллов имеют боковые цепи молекул, в частности, производные имидазола.

Коржуев в своей монографии «Гемоглобин» суммирует литературный материал по кристаллизации гемоглобинов, начиная с 1839 года. Он

bins [47]. He studied the crystallographic properties of human, horse, and dog oxyhemoglobins and concluded that the shape crystals varies greatly between species [44]. He also demonstrated that hemoglobin is crystallized in three forms: rhombic, monoclinic and hexagonal. The species specificity of the hemoglobin crystalline shapes were confirmed by works of B. Sukhomlinov, D. Dvornikova and others [48].

Some authors point out that shapes of crystals of oxy- and deoxyhemoglobin differ. For example, in his article R. Hirsch shows that oxyhemoglobin C can form tetragonal crystals and deoxyhemoglobin C forms flat ones [40]. R. Nagel reports that tetragonal crystals of oxyhemoglobin C may be formed *in vitro* and *in vivo* [39].

According to Kendrew, side chains of molecules, in particular, imidazole derivatives, have a great influence on the shape of the crystals.

In his monograph "Hemoglobin", Korzhuev summarizes the literary data on crystallization of hemoglobins, starting from 1839. He noted species differences of the chromoprotein crystals in different animal species.

Such researchers as French and Perutz [14] investigated individual polymer fibers of deoxyhemoglobin S using electron microscopy.

They showed that the fiber diameter is 200Å [14, 15]. In their research, D. Pumphrey and J. Steinhardt found that deoxyhemoglobin S may grow up to 1 mm in length, and it may be dissolved completely when the temperature drops to 0°C [49].

## Conclusion

Hemoglobin is one of the most well-studied proteins. Decades of researches of hemoglobin in many laboratories worldwide contributed to a significant progress in the description and understanding of the mechanisms of its crystallization and polymerization. Currently, evaluating the mechanisms of various forms of hemoglobin structure formation represents an important task for fundamental studies and practical medicine. The growth process of individual crystals for X-ray diffraction analysis is of a great scientific interest, and it is being studied worldwide. Fibrous structures, microtubules, and tiny crystals of various shapes may be formed at various stages of growth before the final crystal is formed.

These data are needed to understand the mechanism of origin of fibers, microtubules or crystals in RBCs containing pathological forms of hemoglobin (HbS, HbC). The formation of such structures can contribute to lysis of cells, thus leading to impairment of the rheological properties of blood, as well as metabolic processes in the body. The formation of crystals inside the RBC may lead to severe forms of hemolytic and sickle cell anemia. Such types of anemia can cause lethal outcomes. Therefore, gathering



отмечает видовые различия кристаллов этого хромопротеида у различных видов животных.

Френч, Перуц [14] показали с помощью электронной микроскопии отдельные полимерные волокна дезоксигемоглобина-S. Авторы определили, что диаметр волокна равен 200Å [14, 15]. Д. Памфри и Д. Steinhardt в своих исследованиях установили, что дезоксигемоглобин S может вырасти до 1 мм в длину и полностью растворяется при падении температуры до 0°C [49].

### Заключение

Гемоглобин — один из наиболее хорошо изученных белков. Десятки лет исследований гемоглобина во многих лабораториях мира привели к значительному прогрессу в описании и понимании механизмов его кристаллизации и полимеризации. Сейчас исследование механизмов структурирования различных форм гемоглобина является актуальной и важной задачей для фундаментальных исследований и практической медицины. Процесс роста отдельных кристаллов для рентгеноструктурного анализа представляет большой научный интерес и исследуется во всем мире, поскольку на различных стадиях выращивания до того, как об-

knowledge of the mechanisms and properties of crystalline and polymeric forms of hemoglobin might impact choosing a correct resuscitation strategy and treatment options.

разуется конечный кристалл, могут формироваться и волокнистые структуры, и микротрубочки, и мелкие кристаллы различной формы.

Эти знания необходимы для понимания механизма зарождения волокон, микротрубочек или кристаллов в эритроцитах, содержащих патологические формы гемоглобина (HbS, HbC). Образование таких структур может способствовать лизису клеток, что приводит к нарушению реологических свойств крови, а также метаболических процессов в организме. Возникновение кристаллов внутри эритроцита может приводить к тяжелым видам гемолитической и серповидноклеточной анемии. Такие виды анемии могут вызывать летальный исход. Поэтому знание механизмов образования и свойств кристаллических и полимеризованных форм гемоглобина может способствовать правильному выбору стратегии реанимационных мероприятий и лечению больных.

### Литература

1. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Козлова Е.К. Физика и биофизика. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015: 472.
2. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин. Соросовский образовательный журнал. 1998; 4: 33–38.
3. Giege R. A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *FEBS J.* 2013; 280 (24): 6456–6497. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12580>. PMID: 24165393
4. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 2008; 112 (10): 3927–3938. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>. PMID: 18988877
5. Thoreson C.K., O'Connor M.Y., Ricks M., Chung S.T., Sumner A.E. Sickle cell trait from a metabolic, renal, and vascular perspective: linking history, knowledge, and health. *J. Racial. Ethn. Health Disparities.* 2015; 2 (3): 330–335. <http://dx.doi.org/10.1007/s40615-014-0077-4>. PMID: 26322267
6. Hardison R.C. Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2 (12): a011627. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a011627>. PMID: 23209182
7. Волкешштейн М.В. Молекулярная биофизика. М.: Наука; 1975: 616.
8. Winter W.P. A brief history of sickle cell disease. <http://www.sickle-cell.howard.edu/ABriefHistoryofSickleCellDisease.htm>
9. Gormley M. It's in the blood: the varieties of Linus Pauling's work on hemoglobin and sickle cell anemia. <http://scarclibrary.oregonstate.edu/>
10. Frenette P.S., Atweh G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J. Clin. Invest.* 2007; 117 (4): 850–858. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI30920>. PMID: 17404610
11. Bender M.A., Douthitt Seibel G. Sickle cell disease. *Gene Reviews.* 2003; 1993–2016. PMID: 20301551
12. Ralstrom E., da Fonseca M.A., Rhodes M., Amini H. The impact of sickle cell disease on oral health-related quality of life. *Pediatr. Dent.* 2014; 36 (1): 24–28. PMID: 24717705
13. Bookchin R.M., Balazs T., Wang Z., Josephs R., Lew V.L. Polymer structure and solubility of deoxyhemoglobin S in the presence of high concentrations of volume-excluding 70-kDa dextran. Effects of non-s hemoglobins and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (10): 6689–6697. PMID: 10037766
14. Wilson S., Makinen M. Electron microscope study of the kinetics of the fiber-to-crystal transition of sickle cell hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77 (2): 944–948. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.77.2.944>. PMID: 6928690

### References

1. Antonov V.F., Chernysh A.M., Kozlova E.K. Fizika i biofizika. [Physics and biophysics]. Moscow: GEOTAR-Media; 2015: 472. [In Russ.]
2. Blyumenfeld L.A. Gemoglobin. [Hemoglobin]. *Sorosovskiy Obrazovatelnyi Zhurnal.* 1998; 4: 33–38. [In Russ.]
3. Giege R. A historical perspective on protein crystallization from 1840 to the present day. *FEBS J.* 2013; 280 (24): 6456–6497. <http://dx.doi.org/10.1111/febs.12580>. PMID: 24165393
4. Schechter A.N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 2008; 112 (10): 3927–3938. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-04-078188>. PMID: 18988877
5. Thoreson C.K., O'Connor M.Y., Ricks M., Chung S.T., Sumner A.E. Sickle cell trait from a metabolic, renal, and vascular perspective: linking history, knowledge, and health. *J. Racial. Ethn. Health Disparities.* 2015; 2 (3): 330–335. <http://dx.doi.org/10.1007/s40615-014-0077-4>. PMID: 26322267
6. Hardison R.C. Evolution of hemoglobin and its genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2 (12): a011627. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a011627>. PMID: 23209182
7. Volkenshtein M.V. Molekulyarnaya biofizika. [Molecular biophysics]. Moscow: Nauka; 1975: 616. [In Russ.]
8. Winter W.P. A brief history of sickle cell disease. <http://www.sickle-cell.howard.edu/ABriefHistoryofSickleCellDisease.htm>
9. Gormley M. It's in the blood: the varieties of Linus Pauling's work on hemoglobin and sickle cell anemia. <http://scarclibrary.oregonstate.edu/>
10. Frenette P.S., Atweh G.F. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *J. Clin. Invest.* 2007; 117 (4): 850–858. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI30920>. PMID: 17404610
11. Bender M.A., Douthitt Seibel G. Sickle cell disease. *Gene Reviews.* 2003; 1993–2016. PMID: 20301551
12. Ralstrom E., da Fonseca M.A., Rhodes M., Amini H. The impact of sickle cell disease on oral health-related quality of life. *Pediatr. Dent.* 2014; 36 (1): 24–28. PMID: 24717705
13. Bookchin R.M., Balazs T., Wang Z., Josephs R., Lew V.L. Polymer structure and solubility of deoxyhemoglobin S in the presence of high concentrations of volume-excluding 70-kDa dextran. Effects of non-s hemoglobins and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 1999; 274 (10): 6689–6697. PMID: 10037766
14. Wilson S., Makinen M. Electron microscope study of the kinetics of the fiber-to-crystal transition of sickle cell hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77 (2): 944–948. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.77.2.944>. PMID: 6928690

## Reviews

15. *Fabry M.E.* Detection of hemoglobin S polymerization in intact red cells by P-31 NMR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 97 (4): 1399–1406. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(80\)80022-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(80)80022-2). PMID: 7213366
16. *Fabry M.E., Kaul D.K., Raventos C., Baez S., Rieder R., Nagel R.L.* Some aspects of the pathophysiology of homozygous HbCC erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1981; 67 (5): 1284–1291. PMID: 7229029
17. *Feeling-Taylor A.R., Yau S.T., Petsev D.N., Nagel R.L., Hirsch R.E., Vekilov P.G.* Crystallization mechanisms of hemoglobin C in the R state. *Biophys. J.* 2004; 87 (4): 2621–2629. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.039743>. PMID: 15454456
18. *Baptista L.C., Costa M.L., Ferreira R., Albuquerque D.M., Lanaro C., Fertrin K.Y., Surita F.G., Parpinelli M.A., Costa F.F., Melo M.B.* Abnormal expression of inflammatory genes in placentas of women with sickle cell anemia and sickle hemoglobin C disease. *Ann. Hematol.* 2016; 95 (11): 1859–1867. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-016-2780-1>. PMID: 27546026
19. *Bain B.J.* Hemoglobin C disease. *Am. J. Hematol.* 2015; 90 (2): 174. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23915>. PMID: 25488433
20. *Steinberg M.H., Chui D.H.* HbC disorders. *Blood.* 2013; 122 (22): 3698. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-09-526764>. PMID: 24263962
21. *Dalia S., Zhang L.* Homozygous hemoglobin C disease. *Blood.* 2013; 122 (10): 1694. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-04-498188>. PMID: 24137818
22. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavalova A., Kuzovlev A.* Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1–2): 88–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.035>. PMID: 26626224
23. *Safo M.K., Abraham D.J.* X-ray crystallography of hemoglobins. Hemoglobin disorders. *Methods Mol. Biol.* 2003; 82: 1–19. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-373-9:001>
24. *Perutz M.F.* Preparation of haemoglobin crystals. *J. Cryst. Growth.* 1968; 2 (1): 54–56. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0248\(68\)90071-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0248(68)90071-7)
25. *Parashar V., Jeffrey P.D., Neiditch M.B.* Conformational change-induced repeat domain expansion regulates rap phosphatase quorum-sensing signal receptors. *PLoS Biol.* 2013; 11 (3): e1001512. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001512>. PMID: 23526881
26. *Shultis D., Dodge G., Zhang Y.* Crystal structure of designed PX domain from cytokine-independent survival kinase and implications on evolution-based protein engineering. *J. Struct. Biol.* 2015; 191 (2): 197–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.06.009>. PMID: 26073968
27. *Martiny V.Y., Carbonell P., Lagorce D., Villoutreix B.O., Moroy G., Miteva M.A.* In silico mechanistic profiling to probe small molecule binding to sulfotransferases. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e73587. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073587>. PMID: 24039991
28. *Moroz V.V., Kozlova E.K., Chernysh A.M., Gudkova O.E., Bushueva A.V.* Изменение структуры мембран эритроцитов при действии гемина. *Общая реаниматология.* 2012; 8 (6): 5–10. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-6>
29. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A.* Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. <http://dx.doi.org/10.1038/srep06033>. PMID: 25112597
30. *Wood B.R., Asghari-Khiavi M., Bailo E., McNaughton D., Deckert V.* Detection of nano-oxidation sites on the surface of hemoglobin crystals using tip-enhanced raman scattering. *Nano Lett.* 2012; 12 (3): 1555–1556. <http://dx.doi.org/10.1021/nl2044106>. PMID: 22324311
31. *Голубев А.М., Мороз В.В., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Голубев М.А., Калишченко В.Н., Черныш А.М.* Наноструктура интимы аорты человека при развитии атеросклероза (поисково-экспериментальное исследование). *Общая реаниматология.* 2016; 12 (5): 8–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-5-8-18>
32. *Сергунова В.А., Козлова Е.К., Мягкова Е.А., Черныш А.М.* Измерение упруго-эластических свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. *Общая реаниматология.* 2015; 11 (3): 39–44. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3>
33. *Черныш А.М., Белопахов Д.С., Беляевская А.А., Закарян А.В., Куприянова М.С., Постников М.А., Сергеев Е.В., Шогенов И.М.* Научный практикум для студентов по специальности «медицинская физика». *Общая реаниматология.* 2016; 12 (4): 79–88. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-4>
34. *Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Федорова М.С., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С.* Нарушение наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология.* 2011; 7 (2): 5–9. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2011-2>
35. *Козлова Е.К., Черныш А.М., Мороз В.В., Кузовлев А.Н., Сергунова В.А.* Действие ионов цинка на мембраны красных клеток крови *in vitro*. *Мед. физика.* 2011; 4: 43–49.
36. *Перепелица С.А., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Алексеева С.В.* Особенности мембран эритроцитов недоношенных новорожденных
15. *Fabry M.E.* Detection of hemoglobin S polymerization in intact red cells by P-31 NMR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 97 (4): 1399–1406. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X\(80\)80022-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-291X(80)80022-2). PMID: 7213366
16. *Fabry M.E., Kaul D.K., Raventos C., Baez S., Rieder R., Nagel R.L.* Some aspects of the pathophysiology of homozygous HbCC erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 1981; 67 (5): 1284–1291. PMID: 7229029
17. *Feeling-Taylor A.R., Yau S.T., Petsev D.N., Nagel R.L., Hirsch R.E., Vekilov P.G.* Crystallization mechanisms of hemoglobin C in the R state. *Biophys. J.* 2004; 87 (4): 2621–2629. <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.039743>. PMID: 15454456
18. *Baptista L.C., Costa M.L., Ferreira R., Albuquerque D.M., Lanaro C., Fertrin K.Y., Surita F.G., Parpinelli M.A., Costa F.F., Melo M.B.* Abnormal expression of inflammatory genes in placentas of women with sickle cell anemia and sickle hemoglobin C disease. *Ann. Hematol.* 2016; 95 (11): 1859–1867. <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-016-2780-1>. PMID: 27546026
19. *Bain B.J.* Hemoglobin C disease. *Am. J. Hematol.* 2015; 90 (2): 174. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.23915>. PMID: 25488433
20. *Steinberg M.H., Chui D.H.* HbC disorders. *Blood.* 2013; 122 (22): 3698. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-09-526764>. PMID: 24263962
21. *Dalia S., Zhang L.* Homozygous hemoglobin C disease. *Blood.* 2013; 122 (10): 1694. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-04-498188>. PMID: 24137818
22. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Zavalova A., Kuzovlev A.* Nanoparticles of perfluorocarbon emulsion contribute to the reduction of methemoglobin to oxyhemoglobin. *Int. J. Pharm.* 2016; 497 (1–2): 88–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.035>. PMID: 26626224
23. *Safo M.K., Abraham D.J.* X-ray crystallography of hemoglobins. Hemoglobin disorders. *Methods Mol. Biol.* 2003; 82: 1–19. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-373-9:001>
24. *Perutz M.F.* Preparation of haemoglobin crystals. *J. Cryst. Growth.* 1968; 2 (1): 54–56. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-0248\(68\)90071-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-0248(68)90071-7)
25. *Parashar V., Jeffrey P.D., Neiditch M.B.* Conformational change-induced repeat domain expansion regulates rap phosphatase quorum-sensing signal receptors. *PLoS Biol.* 2013; 11 (3): e1001512. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1001512>. PMID: 23526881
26. *Shultis D., Dodge G., Zhang Y.* Crystal structure of designed PX domain from cytokine-independent survival kinase and implications on evolution-based protein engineering. *J. Struct. Biol.* 2015; 191 (2): 197–206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.06.009>. PMID: 26073968
27. *Martiny V.Y., Carbonell P., Lagorce D., Villoutreix B.O., Moroy G., Miteva M.A.* In silico mechanistic profiling to probe small molecule binding to sulfotransferases. *PLoS One.* 2013; 8 (9): e73587. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0073587>. PMID: 24039991
28. *Moroz V.V., Kozlova E.K., Chernysh A.M., Gudkova O.E., Bushueva A.V.* Изменение структуры мембран эритроцитов при действии гемина. *Общая реаниматология.* [Hemin-induced changes in the red blood cell membrane structure. *General Reanimatology.*] 2012; 8 (6): 5–10. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2012-6>. [In Russ.]
29. *Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Gudkova O., Sergunova V., Kuzovlev A.* Transformation of membrane nanosurface of red blood cells under hemin action. *Sci. Rep.* 2014; 4: 6033. <http://dx.doi.org/10.1038/srep06033>. PMID: 25112597
30. *Wood B.R., Asghari-Khiavi M., Bailo E., McNaughton D., Deckert V.* Detection of nano-oxidation sites on the surface of hemoglobin crystals using tip-enhanced raman scattering. *Nano Lett.* 2012; 12 (3): 1555–1556. <http://dx.doi.org/10.1021/nl2044106>. PMID: 22324311
31. *Golubev A.M., Moroz V.V., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Golubev M.A., Kalimichenko V.N., Chernysh A.M.* Наноструктура интимы аорты человека при развитии атеросклероза (поисково-экспериментальное исследование). *Общая реаниматология.* [Nanostructure of human aortic intima in atherosclerosis (a pilot study). *General Reanimatology.*] 2016; 12 (5): 8–15. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-5-8-18>. [In Russ.]
32. *Sergunova V.A., Kozlova E.K., Myagkova E.A., Chernysh A.M.* Измерение упруго-эластических свойств мембраны нативных эритроцитов *in vitro*. *Общая реаниматология.* [In vitro measurement of the elastic properties of the native red blood cell membrane. *General Reanimatology.*] 2015; 11 (3): 39–44. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-3>. [In Russ.]
33. *Черныш А.М., Белопахов Д.С., Беляевская А.А., Закарян А.В., Куприянова М.С., Постников М.А., Сергеев Е.В., Шогенов И.М.* Научный практикум для студентов по специальности «медицинская физика». *Общая реаниматология.* [Scientific practicum for students of the specialty «Medical biophysics». *General Reanimatology.*] 2016; 12 (4): 79–88. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2016-4>. [In Russ.]
34. *Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Fedorova M.S., Kirsanova A.K., Novoderzhkina I.S.* Нарушение наноструктуры мембран эритроцитов при острой кровопотере и их коррекция перфторуглеродной эмульсией. *Общая реаниматология.* 2011; 7 (2): 5–9. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2011-2>
35. *Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A.* Действие ионов цинка на мембраны красных клеток крови *in vitro*. *Мед. физика.* 2011; 4: 43–49.
36. *Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Федорова М.С., Кирсанова А.К., Новодержкина И.С.* Нарушение наноструктуры мембран эритроцитов недоношенных новорожденных

- при многоплодной беременности. *Общая реаниматология*. 2014; 10 (1): 12–18. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1>
37. Мороз В.В., Черныш А.М., Козлова Е.К., Сергунова В.А., Гудкова О.Е., Хорошилов С.Е., Онуфриевич А.Д., Костин А.И. Нарушения морфологии и наноструктуры мембран эритроцитов при длительном хранении эритроцитарной взвеси (исследование при помощи атомной силовой микроскопии). *Бюл. эксперим. биологии и медицины*. 2015; 159 (3): 390–394. <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-015-2975-9>. PMID: 26212816
  38. Перепелица С.А., Сергунова В.А., Алексеева С.В., Гудкова О.Е. Морфология эритроцитов при изоиммунизации новорожденных по резус-фактору и аво-системе. *Общая реаниматология*. 2015; 11 (2): 25–34. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-2-25-34>
  39. Nagel R.L., Fabry M.E., Steinberg M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev.* 2003; 17 (3): 167–178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-960X\(03\)00003-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-960X(03)00003-1). PMID: 12818227
  40. Hirsch R.E., Samuel R.E., Fataliev N.A., Pollack M.J., Galkin O., Vekilov P.G., Nagel R.L. Differential pathways in oxy and deoxy HbC aggregation/crystallization. *Proteins*. 2001; 42 (1): 99–107. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1%3C99::AID-PROT100%3E3.0.CO;2-R](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1%3C99::AID-PROT100%3E3.0.CO;2-R). PMID: 11093264
  41. Leunissen M.E. Protein crystallization. Nijmegen University; 2001: 44.
  42. Ketchum M.A., Olafson K.N., Petrova E.V., Rimer J.D., Vekilov P.G. Hematin crystallization from aqueous and organic solvents. *J. Chem. Phys.* 2013; 139 (12): 121911. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4816106>. PMID: 24089723
  43. Hekmat D. Large-scale crystallization of proteins for purification and formulation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2015; 38 (7): 1209–1231. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1374-y>. PMID: 25700885
  44. Boor A.K. A crystallographic study of pure carbonmonoxide hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1930; 13 (3): 307–316. PMID: 19872525
  45. Bessie M., Weed R.I., Leblond P.F. (eds.). Red blood cell shapes: physiology, pathology, ultrastructure. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1973: 147.
  46. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Fedorova M., Kuzovlev A. Opposite effects of electroporation of red blood cell membranes under the influence of zinc ions. *Acta Bioeng. Biomech.* 2012; 14 (1): 3–13. PMID: 22741531
  47. Strasser B.J. Collecting, comparing, and computing sequences: the making of Margaret O. Dayhoff's Atlas of Protein Sequence and Structure, 1954–1965. *J. Hist. Biol.* 2010; 43 (4): 623–660. <http://dx.doi.org/10.1007/s10739-009-9221-0>. PMID: 20665074
  48. Arie T., Fairhurst R.M., Brittain N.J., Wellems T.E., Dvorak J.A. Hemoglobin C modulates the surface topography of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J. Struct. Biol.* 2005; 150 (2): 163–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2005.02.008>. PMID: 15866739
  49. Pumphrey J.G., Steinhardt J. Crystallization of sickle hemoglobin from gently agitated solutions an alternative to gelation. *J. Mol. Biol.* 1977; 112 (3): 359–375. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(77\)80187-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(77)80187-3). PMID: 875023
- nanostruktury membran eritrotsitov pri ostroi krovopotere i ikh korektsiya perfortoruglerodnoi emulsiiei. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Impairments in the nanostructure of red blood cell membranes in acute blood loss and their correction with perfluorocarbon emulsion. *General Reanimatology*]. 2011; 7 (2): 5–9. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2011-2>. [In Russ.]
35. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Moroz V.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A. Deistvie ionov tsinka na membrany krasnykh kletok krvi *in vitro*. [Influence of zinc ions on the membranes of red blood cells *in vitro*]. *Meditsinskaya Fizika*. 2011; 4: 43–49. [In Russ.]
  36. Perpelitsa S.A., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Alekseyeva S.V. Osobennosti membran eritrotsitov nedonoshennykh novorozhdennykh pri mnogoplodnoi beremennosti. *Obshchaya Reanimatologiya*. [The specific features of red blood cell membranes in premature neonates due to multiple pregnancy. *General Reanimatology*]. 2014; 10 (1): 12–18. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2014-1>. [In Russ.]
  37. Moroz V.V., Chernysh A.M., Kozlova E.K., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Khoroshilov S.E., Onufrievich A.D., Kostin A.I. Narusheniya morfologii i nanostruktury membran eritrotsitov pri dlitelnom khraneni eritrotsitarnoi vzvesi (issledovanie pri pomoshchi atomnoi silovoi mikroskopii). [Disorders in the morphology and nanostructure of erythrocyte membranes after long-term storage of erythrocyte suspension (atomic force microscopy study)]. *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny*. 2015; 159 (3): 406–410. <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-015-2975-9>. PMID: 26212816. [In Russ.]
  38. Perpelitsa S.A., Sergunova V.A., Alekseyeva S.V., Gudkova O.E. Morfologiya eritrotsitov pri izoimmunizatsii novorozhdennykh po rezus-faktoru I avo-sisteme. *Obshchaya Reanimatologiya*. [Erythrocyte morphology in neonatal rhesus factor and ABO isoimmunization. *General Reanimatology*]. 2015; 11 (2): 25–34. <http://dx.doi.org/10.15360/1813-9779-2015-2-25-34>. [In Russ.]
  39. Nagel R.L., Fabry M.E., Steinberg M.H. The paradox of hemoglobin SC disease. *Blood Rev.* 2003; 17 (3): 167–178. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-960X\(03\)00003-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-960X(03)00003-1). PMID: 12818227
  40. Hirsch R.E., Samuel R.E., Fataliev N.A., Pollack M.J., Galkin O., Vekilov P.G., Nagel R.L. Differential pathways in oxy and deoxy HbC aggregation/crystallization. *Proteins*. 2001; 42 (1): 99–107. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0134\(20010101\)42:1%3C99::AID-PROT100%3E3.0.CO;2-R](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0134(20010101)42:1%3C99::AID-PROT100%3E3.0.CO;2-R). PMID: 11093264
  41. Leunissen M.E. Protein crystallization. Nijmegen University; 2001: 44.
  42. Ketchum M.A., Olafson K.N., Petrova E.V., Rimer J.D., Vekilov P.G. Hematin crystallization from aqueous and organic solvents. *J. Chem. Phys.* 2013; 139 (12): 121911. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4816106>. PMID: 24089723
  43. Hekmat D. Large-scale crystallization of proteins for purification and formulation. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2015; 38 (7): 1209–1231. <http://dx.doi.org/10.1007/s00449-015-1374-y>. PMID: 25700885
  44. Boor A.K. A crystallographic study of pure carbonmonoxide hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1930; 13 (3): 307–316. PMID: 19872525
  45. Bessie M., Weed R.I., Leblond P.F. (eds.). Red blood cell shapes: physiology, pathology, ultrastructure. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1973: 147.
  46. Kozlova E., Chernysh A., Moroz V., Sergunova V., Gudkova O., Fedorova M., Kuzovlev A. Opposite effects of electroporation of red blood cell membranes under the influence of zinc ions. *Acta Bioeng. Biomech.* 2012; 14 (1): 3–13. PMID: 22741531
  47. Strasser B.J. Collecting, comparing, and computing sequences: the making of Margaret O. Dayhoff's Atlas of Protein Sequence and Structure, 1954–1965. *J. Hist. Biol.* 2010; 43 (4): 623–660. <http://dx.doi.org/10.1007/s10739-009-9221-0>. PMID: 20665074
  48. Arie T., Fairhurst R.M., Brittain N.J., Wellems T.E., Dvorak J.A. Hemoglobin C modulates the surface topography of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *J. Struct. Biol.* 2005; 150 (2): 163–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2005.02.008>. PMID: 15866739
  49. Pumphrey J.G., Steinhardt J. Crystallization of sickle hemoglobin from gently agitated solutions an alternative to gelation. *J. Mol. Biol.* 1977; 112 (3): 359–375. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(77\)80187-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(77)80187-3). PMID: 875023

Поступила 10.10.16

Received 10.10.16