

## СОСТОЯНИЕ ГЕМОГЛОБИНА ПОСЛЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТТАИВАНИЯ С ГЛИЦЕРИНОМ

Тимченко Н.Н., Шупова Е.В.

Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: timchenko\_n@list.ru

Поступила в редакцию 04.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0580

**Аннотация.** Нами было изучено, как влияет глицерин на HbA. При исследовании влияния криопротектора на конформацию гемоглобина А использовали методы сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа ПСП (первых производных спектров поглощения). Линейный характер зависимости  $\Delta E/E$  (отношение разности поглощения гемоглобина в глицерине и поглощения гемоглобина в физиологическом растворе к поглощению гемоглобина в физиологическом растворе) от концентрации глицерина для растворов гемоглобина А с глицерином соответствует литературным данным и означает, что с помощью метода сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии не фиксируются изменения конформации белка при увеличении концентрации глицерина до 40%. Был проведен анализ ПСП HbA в физиологическом растворе (контроля) и растворов HbA с глицерином, который показал, что они практически не отличаются. После замораживания-оттаивания растворов HbA с глицерином не зафиксировано изменения конформационного состояния белков. Зависимости  $\Delta E/E$  от концентрации глицерина для растворов HbA с глицерином после замораживания-оттаивания не изменились. Был проведен анализ ПСП растворов гемоглобина А с глицерином до и после замораживания-оттаивания. Наблюдается неизменность положений отрицательных максимумов ПСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания от соответствующих образцов до замораживания-оттаивания. Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм на ПСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания практически не отличаются от соответствующих образцов до замораживания-оттаивания. Полученные результаты могут быть связаны с изменением сольватной оболочки биополимеров. Благодаря наличию гидроксильных групп молекулы глицерина способны занимать часть сольватной оболочки HbA с сопутствующим изменением структуры и энергетических параметров макромолекулы, поскольку структура макромолекулы в растворе, как известно, поддерживается растворителем в ближайшем окружении макромолекулы. Стабилизация происходит благодаря водородным связям между неэлектролитами и биополимерами, причем неэлектролиты действуют как заменители воды, хотя эффекты действия растворителя не обязательно являются монотонной функцией состава растворителя.

**Ключевые слова:** гемоглобин, конформация, замораживание-оттаивание.

Гемоглобин относится к числу дыхательных белков, осуществляющих перенос кислорода от лёгких к тканям. Кроме того, гемоглобин прямо и косвенно участвует в переносе углекислого газа. Этот белок широко распространён в природе. Он содержится в эритроцитах всех позвоночных и некоторых беспозвоночных животных, а также в корневых клубеньках некоторых бобовых растений (леггемоглобин). Гемоглобин – основной компонент эритроцитов крови. В каждом эритроците содержится около 280 млн. молекул гемоглобина, каждая из них состоит из 10 000 атомов, в том числе 4 атома железа. Молекулярная масса гемоглобина равна 64500. По химической природе гемоглобин относится к группе гемопротеидов, имеющих в своём составе белок и железосодержащую простетическую группу – гем, на долю которого приходится 4% массы молекулы. Гем – это комплексное соединение протопорфирина IX (одного из 15 теоретически возможных изомеров протопорфирина) с железом. Протопорфирин IX состоит из 4 пирроловых колец, соединённых СН-мостиками со следующими заместителями в боковых цепях: 1,3,5,8-метильные группы, 2,4-винильные группы, 6,7-остатки пропионовой кислоты. В геме железо находится в центре протопорфиринового ядра и связано с 4 атомами пирроловых колец двумя главными (с замещением протона у атомов азота) и двумя дополнительными связями. Поскольку координационное число железа равно 6, остаются 2 неиспользованные координационные связи, которые располагаются в направлениях, перпендикулярных плоскости гема. Одна из них реализуется при связи гема с глобином, а к другой присоединяется кислород или другие лиганды. Гем крайне неустойчив и легко превращается либо в гематин с окислением 2 до трёхвалентного железа и присоединением к последнему гидроксильной группы, либо в гемин, содержащий вместо гидроксильной группы ионизированный хлор. Гемин легко образует устойчивые кристаллы Тейхмана. Гем одинаков для гемоглобина всех видов животных; различия в свойствах гемоглобина обусловлены различием белкового компонента. Молекула гемоглобина является тетрамером, в её состав входят 4 попарно одинаковые полипептидные цепи, совокупность которых и образует белковую часть молекулы – глобин. Молекула гемоглобина человека гетерогенна, что обусловлено различием полипептидных цепей, входящих в её состав. Определена первичная структура глобиновых цепей молекулы гемоглобина А. Отличительной особенностью гемоглобина А является отсутствие в его составе изолейцина и цистина. Цепи альфа и бета гемоглобина А состоят соответственно из 141 и 146 аминокислотных остатков,

связанных в генетически определённой последовательности; в целом молекула гемоглобина содержит 574 аминокислоты. Эти цепи тождественны в 65 и различны в 76 позициях первичной структуры. N-концевые остатки в обеих цепях образованы валином, C-концевые остатки альфа-цепей – аргинином, а бета-цепей – гистидином. Как в альфа-, так и в бета-цепи предпоследнее положение с C-конца занимает тирозин. Рентгеноструктурный метод анализа кристаллов гемоглобина (разрешение 28 нм) позволил выявить основные особенности пространственного расположения как отдельных цепей, так и молекулы гемоглобина в целом. Оказалось, что альфа- и бета-цепи свёрнуты в спиральные сегменты различной длины, которые имеют строение правых альфа-спиралей: 7 спиралей в альфа-цепях и 8 в бета-цепях. Возникающая при этом структура носит название вторичной структуры белковых цепей глобина. Степень спирализации, т.е. относительное число аминокислотных звеньев, заключённых в спиральные участки цепи, составляет в молекуле гемоглобина 70-75%. Рентгеноструктурный анализ молекул гемоглобина показал, что полипептидные цепи с заданной последовательностью аминокислот в результате взаимодействия между боковыми группами аминокислотных остатков свёртываются и образуют сложную нерегулярную трёхмерную структуру. Эта структура стабилизирована гидрофобными и водородными связями, а также электростатическими взаимодействиями. Структура, которая возникает при закручивании полипептидной цепи, содержащей альфа-спиральные участки, называется третичной. Известно, что третичная структура белков определяется их первичной структурой. Поэтому можно было ожидать, что различия в длине и аминокислотном составе альфа- и бета-цепей обусловят различие и в их пространственной конформации. Оказалось, однако, что третичная структура альфа- и бета-цепей молекулы гемоглобина, а также молекул мышечного дыхательного белка – миоглобина почти идентична. Это обусловлено специфическим расположением аминокислот, приводящих к скоплению электронейтральных боковых остатков аминокислот во внутренней части глобулы с образованием гидрофобного ядра. Наружная поверхность глобулы усеяна аминокислотами, несущими электрические заряды и диполи, контактирующие с водой. Каждая полипептидная цепь соединена с гемом. Эта связь является очень специфичной. Доказательством этой специфичности является строгая стехиометричность прохождения реакции с присоединением 4 молей гема к 1 молю глобина. Сродство гема к глобину очень велико. Специфичность связи гема с глобином зависит от их нативности. Нарушения в их структуре обуславливают возникновение неспецифичных центров связывания между ними с потерей способности присоединять кислород. Денатурированный глобин в зависимости от степени денатурации присоединяет от 6 до 24 молей гема.

В настоящее время гемоглобин изучают в биофизических исследованиях [1]. В условиях действия низких температур происходят изменения структуры и функции белков. Исследования структуры и функции белков при замораживании биоматериала помогают выяснению механизмов криоповреждения мембран, субклеточных органелл и клеток. Замораживание изолированных белков дает возможность отыскать причину и структурный уровень повреждения молекулы белка. Исследование состояния белков при низкотемпературном консервировании биоматериала может помочь определить выживаемость клеток после замораживания [2].

К факторам криоповреждения структуры и функции белков относятся: концентрирование в остающейся жидкой фазе (при замораживании биоматериала) солей и других компонентов раствора, дегидратация макромолекул; изменение pH среды и условий межмолекулярных взаимодействий [3,4]. При замораживании-оттаивании белков, имеющих четвертичную структуру, гиперконцентрация электролитов, возникающая в растворе при вымораживании воды, повышенная ионная сила, изменения pH раствора вызывают диссоциацию молекулы белка на субъединицы. Позже может возникать их реассоциация в гибридные формы [5], но добавление некоторых криопротекторов в среду замораживания предупреждает гибридизацию.

Несомненный интерес представляет работа по определению влияния состава среды замораживания (ионной силы, глицерина, 1,2-пропандиола, диметилсульфоксида) на агрегационные свойства липосом из природного фосфатидилхолина (ФХ) или его смеси с фосфатидилсерином (ФС), а также протеолипосом, образованных этими липидами и цитохромом P-450 [6]. Отрицательно заряженные протеолипосомы в большей мере агрегируют при замораживании и действии криопротекторов, чем нейтральные протеолипосомы. Внедрение белка не влияет на устойчивость нейтрального бислоя к агрегирующему действию замораживания и криопротекторов, но существенно снижает устойчивость отрицательно заряженных бислоев.

Проведенное Горбенко Г.П. с соавторами [7] изучение кинетики комплексообразования метгемоглобина с липосомами из ФХ и смеси ФХ с кардиолипином (КЛ) при воздействии глицерина, пропиленгликоля и диметилсульфоксида показало, что повышение эффективности связывания метгемоглобина с липидным бислоем при добавлении криопротекторов в основном обусловлено изменением параметров первой стадии комплексообразования. Действие криопротекторов на характер межмолекулярных связей в комплексе метгемоглобина с липосомами определяется модификацией гидрофобных взаимодействий.

Установлено [8], что низкая температура, глицерин и 1,2-пропиленгликоль влияют на структуру лецитиновых липосом и протеолипосом, образованных лецитином и цитохромом P-450, изменяя площадь поверхности и объем гидрофобной области липидного бислоя.

В исследованиях Жегунова Г.Ф. по изучению влияния криопротекторов на активность Са-АТФазы после замораживания [9] инкубацию саркоплазматического ретикулума (СР) с глицерином, ПЭГ-400, диметилсульфоксидом (ДМСО) в 10%-ной концентрации проводили при 4°C в полиэтиленовых ампулах в течение 20 минут с последующим замораживанием до -196°C. Проведенные эксперименты показали, что инкубация СР с глицерином и ПЭГ-400 приводит к уменьшению активности Са-АТФазы и замедлению скорости аккумуляции ионов кальция. Инкубация мембран с ДМСО, наоборот, приводит к увеличению активности Са-

АТФазы и скорости транспорта ионов кальция внутрь пузырьков СР.

Также отмечено, что при взаимодействии глицерина и ПЭГ-400 с гемоглобином, сывороточным альбумином быка и миозином существенных изменений в структуре белков не наблюдалось, а добавление ПЭГ-400 к раствору  $\gamma$ -глобулина приводит к компактизации макромолекулы белка. ПЭГ различных молекулярных весов способны связываться с гидрофобной полостью сывороточного альбумина быка, существенно не влияя на структуру белка.

В литературе представлено исследование действия глицерина и 1,2-пропандиола на эритроциты [10-14].

Исходя из вышеизложенного, следует отметить, что замораживание-оттаивание в ряде случаев может вызывать изменение структурно-функциональных свойств белков. Криопротекторы, такие, как глицерин, 1,2-пропандиол, полиэтиленгликоли могут предотвращать эти изменения, однако, в больших концентрациях криопротекторы сами могут влиять на конформацию белков.

Для сохранения структурно-функционального состояния биологических объектов в процессе замораживания-оттаивания используются криопротекторы. Широко используемыми для эритроцитов являются глицерин и 1,2-ПД [10-14]. Проведены исследования с ПЭГ-1500 [14-16]. Эти криопротекторы оказались эффективными и для ряда белков [17-19]. Поэтому мы использовали глицерин для сохранения конформации гемоглобина.

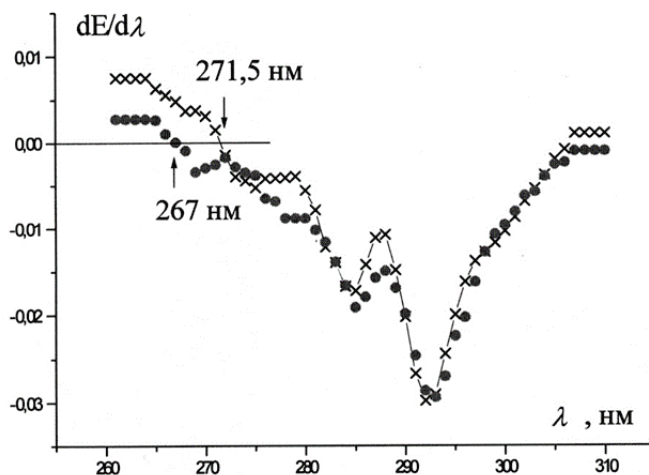
Нами было изучено, как влияет глицерин на НбА. При исследовании влияния криопротектора на конформацию гемоглобина А использовали методы сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии и анализа ИСП (первых производных спектров поглощения).

Линейный характер зависимости  $\Delta E/E$  (отношение разности поглощения гемоглобина в глицерине и поглощения гемоглобина в физиологическом растворе к поглощению гемоглобина в физиологическом растворе) от концентрации глицерина для растворов гемоглобина А с глицерином соответствует литературным данным [20] и означает, что с помощью метода сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии не фиксируются изменения конформации белка при увеличении концентрации глицерина до 40%. Был проведен анализ ИСП НбА в физиологическом растворе (контроля) и растворов НбА с глицерином, который показал, что они практически не отличаются.

После замораживания-оттаивания растворов НбА с глицерином не зафиксировано изменения конформационного состояния белков. Зависимости  $\Delta E/E$  от концентрации глицерина для растворов НбА с глицерином после замораживания-оттаивания не изменились. Был проведен анализ ИСП растворов гемоглобина А с глицерином до и после замораживания-оттаивания. Наблюдается неизменность положений отрицательных максимумов ИСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания от соответствующих образцов до замораживания-оттаивания. Интенсивности отрицательных максимумов в области 284-286 и 292 нм на ИСП растворов гемоглобина А с глицерином после замораживания-оттаивания практически не отличаются от соответствующих образцов после замораживания-оттаивания (рис. 1).

Полученные результаты могут быть связаны с изменением сольватной оболочки биополимеров. Благодаря наличию гидроксильных групп молекулы глицерина способны занимать часть сольватной оболочки НбА с сопутствующим изменением структуры и энергетических параметров макромолекулы, поскольку структура макромолекулы в растворе, как известно, поддерживается растворителем в ближайшем окружении макромолекулы. Стабилизация происходит благодаря водородным связям между неэлектролитами и биополимерами, причем неэлектролиты действуют как заменители воды, хотя эффекты действия растворителя не обязательно являются монотонной функцией состава растворителя.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что методом сольвентно-пертурбационной дифференциальной спектрофотометрии обнаружено, что предпочтительно использовать глицерин для низкотемпературного консервирования гемоглобина А.



**Рисунок 1.** ИСП растворов гемоглобина с глицерином до и после замораживания-оттаивания (x – до замораживания-оттаивания, • – после замораживания-оттаивания)

**Список литературы / References:**

1. Webb K.L., Dominelli P.V. Influence of high hemoglobin-oxygen affinity on human during hypoxia. *Front. Physiol*, 2022, doi: 10.3389/fphys.2021.763933.
2. Пушкаря Н.С., Белоуса А.М. *Актуальные проблемы криобиологии*. К.: Наукова думка, 1981, 608 с. [Pushkar N.S., Belous A.M. K.: Naukova dumka. *Actual problems of cryobiology*, 1981, 608 p. (In Russ.)].
3. Leibo S.P., Mazur P. The role of cooling rates in low temperature preservation. *Cryobiology*, 1971, vol. 8, no. 4, pp. 447-452.
4. Mazur P. Causes of injury in frozen and thawed cells. *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Boil.*, 1965, vol. 24, no. 1, pp. 175-182.
5. Chilson O.P., Costello G.A., Kaplan N.O. Effect freezing on enzymes. *Fed.Proc.*, 1965, vol. 24, no. 2, pp. 55-65.
6. Дюбка Т.С., Горбенко Г.П., Нардид О.А. Влияние среды замораживания на агрегационные свойства липосом. *Фундаментальные и прикладные проблемы криобиологии*, Харьков: Б.И., 1993, с. 44-51 [Dubko T.S., Gorbenko G.P., Nardid O.A. Influence of freezing medium on the aggregation properties of liposomes. Kharkov: B.I. *Fundamental and applied problems of cryobiology*, 1993, pp. 44-51 (In Russ.)].
7. Горбенко Г.П., Дюбка Т.С., Нардид О.А. Влияние криопротекторов на липид-белковые взаимодействия в модельных системах. Харьков: Б.И. *Физико-химические процессы в криобиологических системах*, 1991, с. 14-19 [Gorbenko G.P., Dubko T.S., Nardid O.A. Influence of cryoprotectors on the lipid-protein interactions in model systems. Kharkov: B.I. *Physic and chemical processes in cryobiological systems*, 1991, pp. 14-19 (In Russ.)].
8. Дюбка Т.С., Горбенко Г.П., Нардид О.А., Моисеев В.А. Исследование влияния низких температур и органических растворителей на структуру модельных мембран методом флуоресцентных зондов. *Биофизика*, 1994, т. 39, № 1, с. 58-62 [Dubko T.S., Gorbenko G.P., Nardid O.A., Moiseev V.A. Investigation of influence of low temperature and organic solvents on the structure of model membranes by fluorescence zonds method. *Biofizika*, 1994, vol. 39, no. 1, pp. 58-62 (In Russ.)].
9. Жегунов Г.Ф. Функциональное состояние кальциевого насоса мембран саркоплазматического ретикулума после замораживания в присутствии криопротекторов. К.: Наукова думка. *Вопросы криоконсервирования биологических объектов*, 1978, с. 35-38 [Zhegunov G.F. Functional state of calcium pump of membranes of sarcoplasmatic reticulum after freezing in presence of cryoprotectors. K.: Naukova dumka. *The questions of cryopreservation of biological objects*, 1978, pp. 35-38 (In Russ.)].
10. Лоевский М.М., Воротилин А.М., Белоус А.М., Каплун Е.А., Гусева Н.В. Консервирующее действие глицерина и 1,2-пропандиола при гипотермическом хранении эритроцитов. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 1987, № 7, с. 128 [Loevskiy M.M., Vorotilin A.M., Belous A.M., Kaplun E.A., Guseva N.V. Preserving action of glycerol and 1,2-propandiol at the hypotermic storage of erythrocytes. *Bulletin of the experimental biology and medicine*, 1987, no. 7, p. 128 (In Russ.)].
11. Гучок В.М., Воротилин А.М., Шраго М.И., Гончаров В.И., Положенцева Л.Л. Функциональная сохранность эритроцитов, криоконсервированных под защитой 1,2-пропандиола. Харьков: Б.И. *Криоконсервирование клеток и тканей*, 1989, с. 48-54 [Guchok V.M., Vorotilin A.M., Shrago M.I., Goncharov V.I., Polozhenceva L.L. Functional safety of erythrocytes cryoconserving by protection of 1,2-propandiol. Kharkov: B.I. *Cryopreservation of cell and tissues*, 1989, pp. 48-54 (In Russ.)].
12. Розанова Е.Д., Розанов Л.Ф., Некоз И.А. Кинетика взаимодействия эритроцитов человека с растворами глицерина и 1,2-пропандиола. *Криобиология*, 1989, № 4, с. 30-35 [Rozanova E.D., Rozanov L.F., Nekoz I.A. The kinetics of interation of human erythrocytes with glycerol and 1,2-propandiol solutions. *Cryobiology*, 1989, no. 4, pp. 30-35 (In Russ.)].
13. Vorotilin A.M., Loyevsky M.M. Hypothermal storage of erythrocytes in cryoprotective media containing 1,2-propandiol and glycerol. *Cryo-Letters.*, 1989, no. 10, pp. 371-378.
14. Кучеренко Ю.В., Зинченко А.В., Зинченко В.Д. Фазовые переходы в суспензиях эритроцитов, консервированных с глицерином, 1,2-пропандиолом и ПЭГ-1500. *Проблемы криобиологии*, 1999, № 1, с. 3-8 [Kucherenko Yu.V., Zinchenko A.V., Zinchenko V.D. Phase transitions in erythrocytes suspensions, conserving with glycerol, 1,2-propandiol and PEG-1500. *Problems of cryobiology*, 1999, no. 1, pp. 3-8 (In Russ.)].
15. Ajsjaka K., Iwashita Y. Modification of human-hemoglobin with polyethylene glycol: a new candidate for blood substitute. *Biochem. And Biophys. Research communications*, 1980, vol. 97, no. 3, pp. 1076-1081.
16. Бабийчук Л.А. Конформационные и объемные изменения эритроцитов в процессе замораживания-отогрева в зависимости от условий эквilibрации их с криопротектором ПЭО-1500. *Проблемы криобиологии*, 1997, № 3, с. 8-15 [Babiychuk L.A. Conformational and volume changes of erythrocytes in freezing-thawing process depending of conditions of equilibrating their with cryoprotector PEO-1500. *Problems of cryobiology*, 1997, no. 3, pp. 8-15 (In Russ.)].
17. Леонов Б.Н. Исследование взаимодействия водных растворов сывороточного альбумина с полиэтиленгликолем методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей. К.: Наукова думка. *Современные проблемы криобиологии*, 1976, с. 3-5 [Leonov B.N. The investigation of interaction of water solutions of serum albumin with polyethylenglycol by method of low angle scattering of x-rays. K.: Naukova dumka. *Modern problems of cryobiology*, 1976, pp. 3-5 (In Russ.)].
18. Иванов Л.В., Гаврилова И.И., Моисеев В.А. Исследование действия низких температур и криопротекторов на белки различной структуры. К.: Наукова думка. *Механизмы криоповреждения и криозащиты биологических структур*, 1977, с. 34 [Ivanov L.V., GavriloVA I.I., Moiseev V.A. Investigation of effect

of low temperature and cryoprotectors on the proteins of different structure. K.: Naukova dumka. *The mechanisms of cryodamage and cryoprotection of biological structures*, 1977, p. 34 (In Russ.).

19. Леонов Б.Н. Влияние замораживания и полиэтиленгликоля молекулярной массы 600 на структуру бычьего сывороточного альбумина. *Проблемы криобиологии*, 1993, № 1, с. 27-33 [Leonov B.N. Influence of freezing and polyethyleneglycol molecular mass 600 on the bovine serum albumin structure. *Problems of cryobiology*, 1993, no. 1, pp. 27-33 (In Russ.)].

20. Herskovits T.T., Greenblatt J. Solvent perturbation studies of heme proteins and other colored proteins. II. On the environment and location of the tryptophyl residues in hemoglobin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1969, vol. 130, pp. 30-38.

## STATE OF HEMOGLOBIN AFTER ITS FREEZING-THAWING WITH GLYCEROL

Timchenko N.N., Shupova E.V.

Sevastopol State University

*Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: timchenko\_n@list.ru*

Received 04.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0580

**Abstract.** We have studied the influence of glycerol upon HbA. The cryoprotector effect on conformation of hemoglobin A was investigated using methods of solvent-perturbation differential spectrophotometry and analysis of the IDAS (first derivatives of absorption spectra). Linear nature of the  $\Delta E/E$  dependence (the ratio of the difference between absorption of hemoglobin in glycerol and absorption of hemoglobin in saline to absorption of hemoglobin in saline) on glycerol concentration for hemoglobin A solutions with glycerol corresponds to literature data and means that if glycerol concentration is raised up to 40%, no changes of protein conformation are recorded by the method of solvent-perturbation differential spectrophotometry. An analysis of the IDAS of HbA in saline (control solution) and HbA solutions with glycerol was carried out. After freeze-thawing of HbA solutions with glycerol, no changes in the conformational state of proteins were recorded. The dependences of  $\Delta E/E$  on concentration of glycerol for HbA solutions with glycerol after freeze-thawing did not change. An analysis of the IDAS of hemoglobin A solutions with glycerol before and after freezing-thawing, was carried out. There is a permanence of negative maxima of the IDAS of hemoglobin A solutions with glycerol after freeze-thawing from corresponding samples till freeze-thawing. Intensities of negative maxima within 284-286 and 292 nm on the IDAS of hemoglobin A solutions with glycerol after freeze-thawing slightly differ from corresponding samples before freeze-thawing. The results obtained may be related to a change in the solvate shell of biopolymers. Providing hydroxyl groups, glycerol molecules are capable to occupy part of solvate shell of HbA with corresponding change in structure and energy parameters of the macromolecule, since the structure of the macromolecule in solution is known to be supported by a solvent in the immediate environment of the macromolecule. Stabilization occurs due to hydrogen bonds between nonelectrolytes and biopolymers, with nonelectrolytes acting as water substitutes, although influence effects of solvent not necessarily constitute a monotone function of the solvent composition.

**Key words:** hemoglobin, conformation, freezing-thawing.