

КООПЕРАТИВНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ КИСЛОРОДА ГЕМОГЛОБИНОМ КАК ОДНА ИЗ ОБОБЩАЮЩИХ МОДЕЛЕЙ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОФИЗИКЕ

© 2022 г. И.А. Лавриненко*, Г.А. Вашанов*, А.С. Бучельников**, Ю.Д. Нечипуренко**, ***

*Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

**Севастопольский государственный университет, 299053, Севастополь, ул. Университетская, 33

***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 07.03.2022 г.

После доработки 07.03.2022 г.

Принята к публикации 18.03.2022 г.

Изучение гемоглобина и описание его оксигенации, разработанные для этого термодинамические и математические модели позволили биофизике сделать огромный шаг вперед, а предложенные уравнения, в частности, уравнение Хилла, оказали влияние на развитие науки в самых разных областях. Гемоглобин с его аллостерическим характером регуляции связывания кислорода и других лигандов послужил моделью для огромного числа молекулярно-биологических систем. В обзоре основное внимание уделяется формальному описанию связывания гемоглобином кислорода, рассмотрены основные математические модели, развитые в этой области. Эволюция моделей связывания прослеживается от подходов Хилла и Эдера, Моно–Уаймена–Шанжэ и Кошланда–Немети–Филмера до современных воззрений. Особое внимание уделено разным формальным подходам и представлениям к описанию оксигенации как явлению физической адсорбции.

Ключевые слова: гемоглобин, кооперативность и аллостерия, уравнение Хилла, уравнение Эдера, уравнение Бернарда, модель Моно–Уаймена–Шанжэ, модель Кошланда–Немети–Филмера, симметричная и последовательная модели, модели адсорбции.

DOI: 10.31857/S0006302922030012, EDN: AMUEZH

История описания связывания кислорода гемоглобином представляет общий интерес для биофизиков, так как в ней вырабатывались модели и формировались подходы, которые стали общими для широкого класса задач, описывающих обратимое кооперативное связывание лигандов с макромолекулами [1]. Явление кооперативности пронизывает все уровни живой материи – от молекул до сообществ организмов, и изучение этого явления на молекулярном уровне дает возможность найти ключ к пониманию механизмов, лежащих в основе этого универсального и вместе с тем уникального феномена самосогласованности составных систем (см. работы [2, 3]).

ПРЕДЫСТОРИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ: УРАВНЕНИЕ ГЮФНЕРА

Так как оксигенация является обратимой химической реакцией, то историю исследования феномена кооперативности можно вести от идеи К. Бертолле (1803) [4] об обратной реакции и хи-

мическом равновесии. Эти представления были развиты К. Гульдбергом и П. Вааге (1864–1867) [5], а также Я. Вант-Гоффом (1877) [6], сформулировавшими закон действующих масс, являющийся следствием второго начала термодинамики.

Г. Гюфнер (1890) [7], опираясь на этот закон, предложил уравнение, которое хорошо описывает связывание кислорода мономерным белком миоглобином (родственному гемоглобину, но не имеющим четвертичной структуры):

$$y = \frac{kp}{1 + kp}, \quad (1)$$

$$y = \frac{p}{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)^{-1} + p} = \frac{p}{k^{-1} + p} = \frac{p}{p_{50} + p}, \quad (2)$$

где y – степень насыщения гембелка кислородом, p – парциальное давление кислорода, k – микроскопическая константа равновесия, k_1, k_{-1} – константы прямой и обратной реакции соответствен-

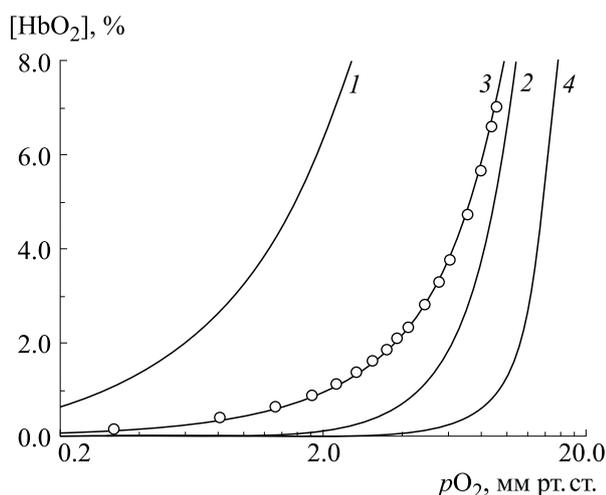


Рис. 1. Аппроксимация экспериментальных точек кривой диссоциации оксигемоглобина (Р. Уинслоу и др. [85]) уравнением Гюфнера (кривая 1), уравнением Хилла с $h = 2.5$ (кривая 2) и $h = 4$ (соответствует числу субъединиц, кривая 4) и уравнением Эдера (кривая 3).

но, p_{50} — давление кислорода, при котором половина макромолекул насыщена лигандом.

С. О'Салливан и Ф. Томпсон (1890) [8], основываясь на работах А. Харкорта (1865–1867) [9] предположили, что скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата и несет в себе экспоненциальную зависимость. Однако в работах Э. Дюкло (1899) [10], В. Анри (1901) [11] и А. Брауна (1902) [12] эта закономерность не подтвердилась. Л. Михаэлис и М. Ментен (1913) [13], используя в качестве теоретической базы закон действующих масс и опираясь на работу Анри, предложили одноименное уравнение (также известное как уравнение Михаэлиса–Анри или Анри–Михаэлиса–Ментен), ставшее основополагающим в ферментативной кинетике:

$$r = \frac{[S]}{K_m + [S]}, \quad (3)$$

$$r = \frac{[S]}{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)^{-1} + \left(\frac{k_1}{k_{-2}}\right)^{-1} + [S]}, \quad (4)$$

где r — относительная (от максимального значения) скорость ферментативной реакции, $[S]$ — концентрация субстрата, k_1 — константа прямой реакции (образование фермент-субстратного комплекса), k_{-1} — константа обратной реакции (распад комплекса до свободного фермента и субстрата), k_{-2} — константа реакции распада комплекса до свободного фермента и продукта, K_m — константа Михаэлиса.

И. Ленгмюр (1916) [14] разработал модель мономолекулярной адсорбции, исходя из следующих представлений: если физическая (квазихимическая) адсорбция является обратимым процессом, то тогда равновесное состояние определяется отношением констант адсорбции и десорбции. Эта зависимость более известна, как изотерма адсорбции Ленгмюра:

$$\theta = \frac{kc}{1 + kc}, \quad (5)$$

$$\theta = \frac{c}{\left(\frac{k_1}{k_{-1}}\right)^{-1} + c} = \frac{c}{k^{-1} + c} = \frac{c}{K_l + c}, \quad (6)$$

где θ — доля занятых центров адсорбции, c — концентрация адсорбата (или давление газа p над адсорбентом), k — константа равновесия, k_1 , k_{-1} — константы прямой и обратной реакции (адсорбции и десорбции соответственно), K_l — константа Ленгмюра.

Таким образом, уравнения Гюфнера, Михаэлиса–Ментен и Ленгмюра описывают сходные физико-химические процессы, формализация которых укладывается в регрессионную математическую модель с уравнениями вида $y = x/(a + x)$. Следует также отметить, что исследования и описания кислородсвязывающих свойств гемоглобина опережали аналогичные работы в области ферментативной кинетики и химии поверхностных явлений.

Рассмотренная регрессионная модель настолько универсальна, что нашла свое применение и в других областях исследований, в частности, полученной Ж. Моно (1949) эмпирической зависимости скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата и носящей его имя (уравнение Моно) [15]:

$$q = \frac{[S]}{K_s + [S]}, \quad (7)$$

где q — относительная (от максимального значения) скорость роста микроорганизма, $[S]$ — концентрация субстрата, K_s — константа половинной скорости роста (аналогичная K_m).

УСПЕШНАЯ АППРОКСИМАЦИЯ КРИВОЙ ДИССОЦИАЦИИ ГЕМОГЛОБИНА: УРАВНЕНИЕ ХИЛЛА

Предложенное Гюфнером уравнение не могло удовлетворительно описать кривую диссоциации оксигемоглобина (рис. 1, кривая 1). Возникший парадокс несоответствия признанного к тому времени закона действующих масс и эксперимента был разрешен А. Хиллом (1910) [16]. Он предположил, что гемоглобин в растворах существует не только в виде отдельных макромолекул,

но и в значительной степени представлен их агрегатами (ассоциатами). Оксигенация при этом происходит путем одновременного присоединения к агрегату нескольких лигандов. Тогда уравнение Гюфнера, исходя из закона действующих масс, может быть приведено к следующему виду:

$$y = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n}, \quad (8)$$

где n – число молекул гемоглобина в его агрегате, K – макроскопическая константа равновесия.

Показатель степени n (который определяли на основании анализа данных) мог принимать нецелочисленные значения и поэтому физический смысл его стал неясен. Хиллом было предложено рациональное объяснение, которое сводилось к тому, что агрегаты гемоглобина имеют переменный состав, а наблюдаемое значение n является статистически усредненным по всем этим формам (рис. 1, кривая 2).

Следует отметить, что приводимые в научной литературе уравнения Гюфнера (1) и Хилла (8) хотя и содержат константы равновесных реакций, имеющие одинаковое обозначение и физический смысл, но, тем не менее, обладают различной размерностью, так как K может быть произведением k_i . Это следует из приведенного уравнения для случая одновременного присоединения n лигандов с одинаковыми равновесными константами:

$$y = \frac{\prod_{i=1}^n k_i p_i}{1 + \prod_{i=1}^n k_i p_i} = \frac{(kp)^n}{1 + (kp)^n} = \frac{p^n}{k^{-1/n} + p^n} = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n}. \quad (9)$$

Уравнение Хилла получило признание, однако каким образом молекулы гемоглобина в агрегатах синхронизировали между собой связывание молекул кислорода – оставалось неясным. Вместе с тем предположение об одновременном связывании лигандов подразумевало существование некоторой согласованности этих процессов.

Теоретическое описание подобных процессов появилось в начале XX века в области статистической физики. Исследуя ферромагнитные свойства материалов, В. Ленц предложил модель (1920), позволяющую в общем виде охарактеризовать сильную анизотропию ферромагнетиков. Под руководством Ленца Э. Изинг разработал математическое описание этой модели для одномерного случая [17]. Модель Ленца–Изинга стала одной из наиболее известных моделей статистической физики для систем, где проявляются коллективные эффекты.

Д. Хартри (сотрудничавший в области физиологии с Хиллом) реализовал идею самосогласованного поля применительно к описанию много-

электронных атомов и молекул, как способ приближенного решения уравнения Шредингера (1927–1928) [18]. В это же время Р. Фаулер (ученик Хилла и научный руководитель Хартри) ввел в оборот термин «кооперативные переходы» (1929), который изначально касался фазовых переходов в магнетиках, сплавах и растворах [19]. В дальнейшем понятия «самосогласованности» и «кооперативности» найдут и расширят свое применение в различных научных областях знаний, а модель Ленца–Изинга будет востребована при описании кооперативных эффектов связывания лигандов с макромолекулами [20, 21].

МОЛЕКУЛА ГЕМОГЛОБИНА – ЭТО ТЕТРАМЕР

Г. Эдер (1925) [22] показал, что молекула гемоглобина представляет собой тетрамер. Т. Сведберг (1926) [23], принимая во внимание результаты этого исследования и сопоставляя их с собственными экспериментальными данными (полученными методом аналитического центрифугирования), также пришел к этому выводу.

Хотя открытие олигомерной структуры макромолекулы и не противоречило представлениям Хилла о существовании агрегатов гемоглобина, оно не объясняло, почему показатель степени не соответствует числу субъединиц, меньше их количества и принимает нецелочисленные значения. Это снова привело к затруднениям физической трактовки коэффициента Хилла [24].

Так как показатель степени в уравнении уже не отражал число субъединиц n (но был с ним сопряжен), то, чтобы избежать путаницы в обозначениях, стали использовать для этого коэффициента другие символы или их сочетания: n_H , h , α и т.д. [25–30]:

$$y = \frac{p^h}{p_{50}^h + p^h}, \quad (10)$$

где h – коэффициент Хилла, а p_{50} – величина 50%-го насыщения гемоглобина кислородом (иногда обозначаемая как константа Хилла K_H [31–34], аналогично константе Михаэлиса K_m в одноименном уравнении).

Уравнение Хилла обладает важной особенностью – по его коэффициенту h можно оценить степень кооперативного взаимодействия субъединиц, которую принято характеризовать как отрицательную кооперативность ($h < 1$), положительную кооперативность ($h > 1$) или ее отсутствие ($h = 1$). Этот параметр дает общее представление о кооперативности, согласно которому предполагается, что она постоянна и не зависит от концентрации лиганда. Сопоставление значений величин h оказалось весьма полезным в срав-

нительном анализе олигомерных белков, а также оценки изменений в их структуре при воздействии различных физико-химических агентов [35].

Следует также отметить, что параметр h может быть представлен в виде функции от числа субъединиц, подобно кажущейся молекулярной массе белка или гидродинамическому радиусу макромолекулы, величины которых также сопряжены с массой и геометрией макромолекулы, но весьма опосредованным образом (см. ниже).

Уравнение (10) (также известное как уравнение Хилла—Ленгмюра [36, 37]) получило широкое распространение в силу своей простоты и хорошей аппроксимирующей способности [38–41], несмотря на имеющееся сложности в соотношении коэффициента h с числом субъединиц n , а также недостаточную реалистичность физической модели одновременного присоединения лигандов [42]. Уравнение Хилла нашло свое применение в энзимологии, фармакологии [33, 43], в

задачах моделирования регуляции транскрипции гена [44, 45], а также различных зависимостей типа «доза—эффект» [30, 46].

ОТ ИДЕИ ОДНОВРЕМЕННОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ К ИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОМУ ПРИСОЕДИНЕНИЮ

Уравнение Хилла не может одинаково хорошо аппроксимировать кривую оксигенации во всем диапазоне парциальных давлений кислорода, особенно в области его малых значений (рис. 1, кривая 2). Если предположить, что в границах предложенной модели (и формализации данным уравнением) происходит одновременное присоединение молекул кислорода к тетрамеру с различающимися равновесными константами для каждой из четырех субъединиц, то это также не улучшит качество аппроксимации кривой диссоциации оксигемоглобина:

$$y = \frac{k_1 p \cdot k_2 p \cdot k_3 p \cdot k_4 p}{1 + k_1 p \cdot k_2 p \cdot k_3 p \cdot k_4 p} = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4 p^4}{1 + k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4 p^4} = \frac{k^4 p^4}{1 + k^4 p^4} = \frac{K p^4}{1 + K p^4}, \quad (11)$$

где k_1, k_2, k_3 и k_4 — константы равновесных реакций для каждой из субъединиц, k^4 — произведение констант k_1 – k_4 , K — макроскопическая константа.

Следует отметить, что когда константы k_1 – k_4 равны между собой, среднее арифметическое и геометрическое для них совпадают. В противном случае K будет смещено в сторону меньших значений относительно K для равных k_1 – k_4 . Так как в этом случае значения k_1 – k_4 нельзя найти из их произведения, то и определить, равны ли они между собой, соответственно, не представляется возможным.

На этом этапе возможности уравнения Хилла в аппроксимации экспериментальных данных себя исчерпали [47]. Доминирующей версией в описании оксигенации стала идея о последовательном присоединении лигандов.

УРАВНЕНИЕ ЭДЕРА И ЕГО ЭВОЛЮЦИЯ

Опираясь на закон действующих масс и идею о последовательном присоединении молекул кислорода к тетрамеру, Г. Эдер (1925) [22] получил уравнение оксигенации для идеального раствора гемоглобина:

$$y = \frac{0.25 \cdot K_1 p + 0.5 \cdot K_2 p^2 + 0.75 \cdot K_3 p^3 + K_4 p^4}{1 + K_1 p + K_2 p^2 + K_3 p^3 + K_4 p^4}, \quad (12)$$

где K_1 – K_4 — равновесные макроскопические константы.

Для макроскопических констант со значениями $K_1 = 1$, $K_2 = 3/8$, $K_3 = 1/16$ и $K_4 = 1/256$, выведенными из кинетической теории, уравнение (12) сводится к частному случаю уравнения Хилла, т.е. уравнению Гюфнера, применимому для аппроксимации кривой оксигенации одной из субъединиц гемоглобина:

$$y = \frac{0.25 \cdot K_1 p}{1 + 0.25 \cdot K_1 p}. \quad (13)$$

В отличие от уравнения Хилла (8)–(10), где рассматривается одновременное присоединение лигандов, последовательное присоединение лигандов осуществляется в четыре этапа. В последнем случае также могут быть рассмотрены варианты последовательного присоединения лигандов с одинаковой равновесной константой или, как минимум, варианта, где хотя бы одна из равновесных констант отличается от остальных.

Г. Эдер предположил [22], что если четыре атома гемового железа будут расположены достаточно близко друг к другу, то такая система с полностью занятыми местами связывания лигандов станет гораздо стабильней, чем ее промежуточные состояния, выразив это следующей зависимостью:

$$y = \frac{0.25 \cdot Kp + 0.25 \cdot (Kp)^2 + 0.25 \cdot (Kp)^3 + (Kp)^4}{1 + Kp + 0.5 \cdot (Kp)^2 + 0.3 \cdot (Kp)^3 + (Kp)^4} \quad (14)$$

В то время Эдером, вероятно, была предпринята одна из первых попыток связать феноменологическое уравнение с еще неизвестной пространственной структурой данной макромолекулы.

Л. Полинг (1935) [48] переосмыслил уравнение Эдера с позиции биофизической химии. Взяв за основу геометрию макромолекулы в виде вариантов расположения гемов по краям квадрата или в вершинах тетраэдра, предложил свои версии уравнения оксигенации. Уравнение, основанное на предположении о том, что макромолекула представляет собой квадрат, оказалось ошибочным. Близкая к естественной структуре гембелка модель в виде тетраэдра привела к наиболее точному решению этой задачи:

$$y = \frac{K_e p + 3 \cdot \alpha K_e^2 p^2 + 3 \cdot \alpha^3 K_e^3 p^3 + \alpha^6 K_e^4 p^4}{1 + 4 \cdot K_e p + 6 \cdot \alpha K_e^2 p^2 + 4 \cdot \alpha^3 K_e^3 p^3 + \alpha^6 K_e^4 p^4} \quad (15)$$

где K_e – константа связывания лиганда ($RT \cdot \ln K_e$ – в представлениях термодинамики, как изменение свободной энергии, сопровождающее присоединение кислорода к гемму), α – константа (величина $RT \cdot \ln \alpha$ трактуется в термодинамике, как дополнительная свободная энергия, стабилизирующая две взаимодействующие группы «кислород–гем»).

И. Клотц (1946) [49], работая с белком, имеющим множественные центры связывания кальция, рассмотрел возможность применения закона действующих масс к описанию связывания большого количества лигандов с макромолекулой. В частности, он выполнил деконволюцию макроскопических констант до уровня микроскопических констант равновесных реакций и представил модифицированное уравнение Эдера (далее известное как уравнение Эдера–Клотца):

$$y = \frac{k_1 p + 2 \cdot k_1 k_2 p^2 + 3 \cdot k_1 k_2 k_3 p^3 + 4 \cdot k_1 k_2 k_3 k_4 p^4}{4 \cdot (1 + k_1 p + k_1 k_2 p^2 + k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4)} \quad (16)$$

или способом, где знаменатель является статистической суммой [50, 51]:

$$y = \frac{k_1 p + 3 \cdot k_1 k_2 p^2 + 3 \cdot k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4}{1 + 4 \cdot k_1 p + 6 \cdot k_1 k_2 p^2 + 4 \cdot k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4} \quad (17)$$

Из этого уравнения, зная численные значения макроскопических констант $K_1–K_4$, которые могут быть получены решением обратной задачи (т.е. аппроксимацией данной зависимости к экспериментальным данным), несложно вычислить (кажущиеся) константы равновесных реакций ($k_1–k_4$).

Таким образом, обобщенное уравнение для одинаковых n сайтов связывания лигандов L будет иметь следующий вид:

$$y = \frac{\sum_{i=1}^n i \prod_{i=1}^n k_i [L]^i}{n \left(1 + \sum_{i=1}^n \prod_{i=1}^n k_i [L]^i \right)} \quad (18)$$

Следует отметить, что уравнение Эдера обеспечивает большее согласие с экспериментом не только по причине более реалистичного представления об оксигенации (рис. 1, кривая 3) как ступенчатом процессе связывания лигандов, но и как математическая модель, имеющая четыре подгоночных параметра ($K_1–K_4$) вместо двух (p_{50} и h), как в уравнении Хилла.

Однако нахождение коэффициентов Эдера затруднено подбором исходных значений для этих коэффициентов при их оптимизации. Это зачастую приводит к большим ошибкам при вычислении таких коэффициентов, в том числе, из-за случайных ошибок экспериментальных данных [52, 53].

МИОГЛОБИН И ГЕМОГЛОБИН – ПЕРВЫЕ БЕЛКИ, ДЛЯ КОТОРЫХ ПОЛНОСТЬЮ УСТАНОВЛЕНА ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА

Исследование структуры белков является одним из наиболее значимых направлений биофизики, биохимии, молекулярной биологии, смежных с ними наук и является вполне самостоятельной задачей. Вместе с тем, более точное описание процесса кооперативного связывания кислорода гемоглобином потребовало понимания пространственной организации макромолекулы.

Предложенный М. Перутцем (1953) метод изоморфного замещения позволил вывести рентгеноструктурный анализ на новый уровень, что дало возможность впервые получить проекции распределения электронной плотности для макромолекул миоглобина (Дж. Кендрию) и гемоглобина (М. Перутц). Л. Блюменфельд (1954) обобщил свои исследования по структуре гемоглобина и, предвосхищая результаты Перутца, сделал вывод о существовании конформационных перестроек этой макромолекулы в ходе ее оксигенации [54].

Начатые Перутцем в 1937 году исследования структуры гемоглобина при помощи дифракции рентгеновских лучей привели к определению Кендрию (1957) пространственного расположения полипептидных цепей миоглобина. Стало ясно, что молекулы белков не укладываются в существующие структурные модели, основанные на простом геометрическом порядке. С повышени-

ем разрешающей способности получаемых изображений Кендрю (1958) [55] и Перутц (1959) [56] полностью установили пространственную организацию этих белков.

Дальнейшие исследования Перутца преимущественно были направлены на понимание работы «молекулярной машины» гемоглобина в части стереохимии кооперативных эффектов (1970) [57], а также вопросов регуляции аффинности кислорода к гембелку в контексте структурных перестроек данной макромолекулы (1979) [58].

ГИПОТЕЗА УАЙМЕНА–АЛЛЕНА И УРАВНЕНИЕ БЕРНАРДА

Д. Аллен, К. Гуте и Дж. Уаймен (1950) провели эксперименты по изучению кислородсвязывающих свойств гемоглобина спектрофотометрическим методом, отметив уникальность гемопротидов, как самого разнообразного и красивого класса «молекулярных машин», известных биохимикам [59]. Далее Уаймен и Аллен (1951) предприняли попытку интерпретировать связывание кислорода с гемоглобином, а также некоторые другие родственные реакции в терминах структурных эффектов, отмечая, что этот белок может быть рассмотрен как фермент, расширяя тем самым границы применимости аналитических выводов своей работы [60].

Основываясь на гипотезе Уаймена–Аллена, предполагающей одновременное связывание гембелком двух молекул кислорода, Бернард (1960) предложил следующее уравнение оксигенации [61]:

$$y = 1/4 \frac{2 \cdot \omega(p/p_{50})^2 + 4 \cdot \omega(p/p_{50})^4}{1 + \omega(p/p_{50})^2 + \omega(p/p_{50})^4}. \quad (19)$$

где ω – некоторый постоянный кинетический коэффициент.

Как следует из математических соотношений констант, коэффициентов и переменных в этом уравнении, оно априори будет давать лучшее приближение кривой оксигенации относительно уравнения Хилла. В уравнении Хилла два подгоночных параметра – p_{50} и h , а уравнение Бернарда, имеющее то же самое количество параметров (ω и p_{50}), также представлено в числителе суммой двух слагаемых с показателями в степенях 2 и 4 (которые обоснованы как имеющие физический смысл). Однако уравнение Бернарда менее эффективно в аппроксимации, чем уравнение Эдера, так как последнее содержит четыре подгоночных параметра $K_1–K_4$, а в числителе представлено суммой четырех слагаемых с показателями в степенях, соответствующих количеству последовательно присоединенных молекул кислорода.

К достоинствам уравнения Бернарда следует отнести простоту вычисления параметров (как и в уравнении Хилла). Однако при помощи этого уравнения невозможно оценить степень кооперативного взаимодействия субъединиц макромолекулы.

НАЧАЛО СИСТЕМНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕХАНИЗМОВ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

Исследование кооперативности белков дополнилось изучением этого явления в нуклеиновых кислотах, что приводило к общему пониманию механизмов регуляции синтеза белков и метаболических путей.

Начатые Ф. Жакобом и Ж. Моно совместно с А. Парди (1957–1959) [62] исследования по изучению лактозной системы привели к разработке модели оперона прокариот (1961) [63], где рассматривались регуляторные механизмы синтеза белков. Расширяя область своих исследований в сторону изучения регуляции ферментативной активности белков, Жакоб и Моно (1961–1962) отметили следующее: «может показаться, что некоторые ферменты, действующие на критических стадиях метаболизма, избирательно наделены специфическими функциями регуляции и координации, и с помощью этих белков данная биохимическая реакция, в конечном итоге, контролируется метаболитом, действующим скорее как физиологический «сигнал», чем как химически необходимый компонент самой реакции» [64, 65].

Моно, Жакоб и Ж. Шанжё (1963) предлагают концепцию «Аллостерические белки и системы клеточного контроля» [66], в рамках которой определены классы аллостерических эффектов и сформулированы общие свойства аллостерических систем.

Основные тезисы концепции таковы:

1) биологическая активность многих белков контролируется специфическими метаболитами, не взаимодействующими непосредственно с субстратами или продуктами реакций;

2) эффект этих регуляторных агентов, по-видимому, является результатом исключительно конформационного изменения (аллостерического перехода), индуцируемого в белке, когда он связывает агент;

3) предполагается, что этот механизм играет существенную роль в регуляции метаболической активности, а также, возможно, специфическом контроле синтеза белка.

СИММЕТРИЧНАЯ (СОГЛАСОВАННАЯ) МОДЕЛЬ МОНО–УАЙМЕНА–ШАНЖЁ

Объединив усилия, Моно, Уаймен и Шанжё, рассматривая кооперативность на примере оксигенации гемоглобина, предлагают модель (модель MWC [67]), объясняющую аллостерические переходы в белках, состоящих из идентичных субъединиц (в оригинале статьи – протомеров).

Модель описывается следующими утверждениями [67]:

1) аллостерические белки представляют собой олигомеры, субъединицы которых связаны таким образом, чтобы все они занимали равнозначные позиции (т.е. макромолекула имеет хотя бы одну ось симметрии);

2) каждому лиганду соответствует один и только один сайт на каждой субъединице (т.е. симметрия каждого набора стереоспецифических рецепторов такая же, как симметрия молекулы);

3) конформация каждой субъединицы ограничена ее ассоциацией с другой субъединицей;

4) по крайней мере два состояния обратимо доступны аллостерическим олигомерам; эти состояния отличаются распределением и/или энергией связей между субъединицами и, следовательно, накладываемыми на них конформационными ограничениями;

5) в результате таких взаимодействий изменяется сродство одного (или нескольких) стереоспецифических сайтов к соответствующему лиганду при переходе из одного состояния в другое;

б) при переходе белка из одного состояния в другое его молекулярная симметрия сохраняется (включая симметрию конформационных ограничений, налагаемых на каждую субъединицу).

С формальной позиции функция состояния равновесия между напряженными (**Tense**) и расслабленными (**Relax**) симметричными по субъединицам конформациям белка (доля *R*-форм) может описана как:

$$R = \frac{(1+z)^n}{L(1+kz)^n + (1+z)^n}, \tag{20}$$

тогда степень насыщения белка лигандом будет описана следующим уравнением:

$$y = \frac{Lkz(1+kz)^{n-1} + z(1+z)^{n-1}}{L(1+kz)^n + (1+z)^n}, \tag{21}$$

где *R* – доля *R*-форм (молекул белка в *R*-состоянии), *L* – равновесная константа (аллостерическая константа) для $[T_0]/[R_0]$, а *T*₀ и *R*₀ – состояния макромолекул свободных от лигандов, *k* – отношение констант диссоциации *K*_T и *K*_R (т.е. констант сродства к лиганду), *z* – нормированная на *K*_R концентрация лиганда, *n* – число лигандов.

При *L* = 0 (одно состояние макромолекулы, *R*) и *k* = 1 отношение принимает вид уравнения Гюфнера (1) или тождественных ему уравнений Ленгмюра (5) и Михаэлиса–Ментен (3):

$$y = \frac{z(1+z)^{n-1}}{(1+z)^n} = \frac{z}{1+z} = \frac{cK_R^{-1}}{1+cK_R^{-1}} = \frac{c}{K_R+c} = \frac{p}{p_{50}+p}. \tag{22}$$

Следует отметить, что в модели MWC (21) также просматриваются уравнения Хилла и Эдера, так как все эти зависимости вытекают из закона действующих масс [68].

Модель симметричного взаимодействия Моно–Уаймена–Шанжё, так же, как и уравнение Хилла, нашла свое широкое применение в энзимологии и фармакологии, хорошо объясняя положительную кооперативность за счет изменения соотношения молекул в *T* и *R* состоянии. Вместе с тем данная модель не позволяет выявить природу отрицательной кооперативности [26].

В дальнейшем модель MWC была расширена и обобщена [25, 69, 70]. Рассматриваются более чем два состояния макромолекулы, неидентичные субъединицы и сайты связывания, а также присоединение различных по своему типу лигандов и аллостерических модуляторов [27, 71–73].

МОДЕЛЬ ИНДУЦИРОВАННОГО СООТВЕТСТВИЯ (ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНАЯ МОДЕЛЬ) КОШЛАНДА–НЕМЕТИ–ФИЛМЕРА

Как уже отмечалось, уравнение Хилла дает разумное приближение к экспериментальным данным и позволяет оценить величину кооперативного взаимодействия субъединиц. Уравнение Эдера не дает теоретического объяснения сущности этого процесса. Переосмыслив данное уравнение, Полинг предпринял первую попытку связать изменение этих констант с геометрией белка, рассматривая одну константу как константу равновесия *K*_e, а вторую – как константу взаимодействия *α*, зависящую от геометрии макромолекулы.

Д. Кошланд, Г. Немети и Д. Филмер (1966), опираясь на данные о структурной перестройке олигомеров, уточнили биохимический концепт механизма связывания лигандов макромолеку-

лой, предложенного Полингом, и разработали свою модель (модель KNF, известная также как модель Полинга/Кошланда–Немети–Филмера) [74, 75]. Модель построена на следующих допущениях и ограничениях:

1) каждая субъединица олигомера может существовать в одной из двух конформаций – неактивной или активной, без сохранения молекулярной симметрии макромолекулы;

2) только активная конформация способна в значительной степени связывать лиганд;

3) связывание лиганда одной из субъединиц должно сопровождаться ее немедленным переходом из неактивной конформации в активную;

4) такой переход реализуется с помощью механизма «индуцированной подгонки» («самосогласованности»);

5) кооперативность должна возникать как следствие взаимодействия между субъединицами;

б) сила такого взаимодействия варьируется и зависит от относительных конформаций вовлеченных в этот процесс субъединиц.

Авторы модели рассмотрели несколько вариантов взаимодействия субъединиц из использованной Полингом номенклатуры геометрических конфигураций: тетраэдр, квадрат, линейная структура и согласованная модель, в которой конформации всех субъединиц меняются одновременно. К этим конфигурациям выведены соответствующие уравнения связывания лигандов.

Уравнение для конфигурации «тетраэдр» имеет следующий вид:

$$y = \frac{K_{AB}^3 (K_C K_t [C]) + 3 \cdot K_{AB}^4 K_{BB} (K_C K_t [C])^2 + 3 \cdot K_{AB}^3 K_{BB}^3 (K_C K_t [C])^3 + K_{BB}^6 (K_C K_t [C])^4}{1 + 4 \cdot K_{AB}^3 (K_C K_t [C]) + 6 \cdot K_{AB}^4 K_{BB} (K_C K_t [C])^2 + 4 \cdot K_{AB}^3 K_{BB}^3 (K_C K_t [C])^3 + K_{BB}^6 (K_C K_t [C])^4}, \quad (23)$$

где y – степень насыщения лигандом в пересчете на одну субъединицу, $[A]$ – концентрация субъединиц с неактивной конформацией, $[B]$ – концентрация субъединиц с активной конформацией, $[C]$ – концентрация лиганда, K_t – константа равновесия $[B]/[A]$, K_C – константа равновесия $[BC]/([B][C])$, K_{AB} – константа равновесия $([AB][A])/([AA][B])$, K_{BB} – константа равновесия $([BB][A][A])/([AA][B][B])$.

При отсутствии взаимодействий между субъединицами уравнение сводится к известной зависимости (1):

$$y = \frac{K_C K_t [C]}{1 + K_C K_t [C]} = \frac{kp}{1 + kp} = \frac{p}{p_{50} + p}. \quad (24)$$

Таким образом, последовательная модель снижает чрезмерное упрощение симметричной модели в представлении кооперативности [76, 77], как синхронной структурной перестройки всей макромолекулы, и учитывает конформационные изменения отдельных сайтов связывания [78].

Тем не менее, А. Корниш-Боуден (2013) отмечает, что обе модели MWC и KNF являются феноменологическими и потому не отвечают на фундаментальный вопрос о том, как связывание лиганда дает наблюдаемый аллостерический эффект. Современные программы расчетов структур белков в сочетании со структурными, термодинамическими и кинетическими исследования-

ми позволяют подойти к решению этого вопроса [79].

УРАВНЕНИЯ, НЕСУЩИЕ В СВОЕЙ ОСНОВЕ ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНЫЕ ЗАВИСИМОСТИ

Рассмотренные ранее уравнения, соответствующие моделям MWC и KNF, несут в себе степенную зависимость и являются следствием закона действующих масс. Рядом исследователей были предприняты попытки получить альтернативные модели связывания кислорода гемоглобином, базирующиеся на постулировании переходного процесса, к которому неприменим этот закон. Скорость оксигенации гембелка в таком случае определяется показательной (экспоненциальной) функцией.

Исходя из этих представлений, И. Высочинной (1963) [80] предложено уравнение следующего вида:

$$y = 1 - \left[1 + bp + \frac{(bp)^2}{2} + \frac{(bp)^3}{3} \right] e^{-bp}, \quad (25)$$

где b – переменный кинетический коэффициент.

Опираясь в своей основе на уравнение Гюфнера и предполагая, что константа связывания лиганда является функцией степени деформации макромолекулы белка, экспоненциально зависящей от парциального давления кислорода, П. Подрабинек и И. Каменский (1968) [81] представили свою модель:

$$y = \frac{\gamma p e^{\lambda p}}{1 + \gamma p e^{\lambda p}}, \quad (26)$$

где γ и λ – постоянные положительные кинетические коэффициенты, а $k = \gamma e^{\lambda p}$ – константа равновесия реакции.

Уравнение, представленное Ю. Кисляковым и соавт. (1975) [82], выглядит следующим образом:

$$y = \left[1 - \exp\left(-\frac{bp}{10}\right) \right]^{\frac{1}{b}}, \quad (27)$$

где b – кинетический коэффициент.

Функция, предложенная М. Ханиным (1978) [83], аналогична предыдущим и имеет следующий вид:

$$y = 1 + \delta_1 e^{-\delta_2 p}, \quad (28)$$

где δ_1 и δ_2 – постоянные кинетические коэффициенты.

Таким образом, построение уравнений оксигенации гемоглобина, в принципе, может быть основано как на степенных, так и на экспоненциальных зависимостях.

АНАЛИЗ МОДЕЛЕЙ КООПЕРАТИВНОГО СВЯЗЫВАНИЯ КИСЛОРОДА ГЕМОГЛОБИНОМ

Как было показано, существует ряд моделей, которые могут быть использованы для аппроксимации экспериментальных данных кривой диссоциации оксигемоглобина. Также аналитически можно выявить взаимосвязь отношений, коэффициентов и констант в приведенных уравнениях оксигенации, что было выполнено ранее, и в определенной степени, нами систематизировано.

Однако системная верификация наиболее известных моделей, описывающих связывание гемоглобина с кислородом, на предмет наилучшего соответствия данным эксперимента не проводилась. Это обстоятельство не позволяет сравнить эффективность их аппроксимации, так как ранее проводившиеся разрозненные вычисления были выполнены на неперекрывающихся наборах данных, имеющих различное количество экспериментальных точек, полученных с той или иной погрешностью измерений.

Для уравнений, соответствующих моделям MWC и KNF, трудно решить обратную задачу (не всегда можно найти значения подгоночных параметров). Вместе с тем уравнения для моделей Моно–Уаймена–Шанжэ и Кошланда–Немети–Филмера имеют общую основу с уравнениями Гюфнера, Хилла, Бернарда и Эдера, несущими в себе степенную зависимость, что позволяет также использовать их в качестве уравнений, определяющих способ присоединения лигандов: одновре-

менно (уравнение Хилла), комбинированно (уравнение Бернарда) или последовательно (уравнение Эдера).

В работе [84] были сопоставлены разные модели оксигенации с целью выяснить, какие из них могут описать реальный эксперимент наилучшим образом. Был использован набор данных, полученных Р. Уинслоу (1977) [85], как одних из наиболее полных и точных известных результатов измерений связывания кислорода гемоглобином.

Результаты проведенных исследований показывают, что близость высоких значений коэффициентов детерминации для моделей Эдера, Бернарда и Хилла в совокупности с общностью в представлении ими процесса оксигенации могут косвенно указывать на характер присоединения кислорода гемоглобином, а именно на его ступенчатость, обусловленную структурными перестройками макромолекулы белка при связывании ею лигандов в ходе равновесных реакций. При этом используемый в построении альтернативных моделей подход, который основан на экспоненциальной зависимости, в совокупности с высоким разбросом значений более низкого коэффициента детерминации в этой группе уравнений также, на наш взгляд, методом исключения это подтверждает [84].

Кластерный анализ показал общность в семействах уравнений со степенной и экспоненциальной зависимостями (рис. 2). Анализ выявил, что уравнение Эдера и скоррелированная с ним модель Кошланда–Немети–Филмера в рамках формальных критериев наилучшим образом подходят для аппроксимации и описания экспериментальных данных связывания гемоглобином кислорода [84].

Тем не менее, следует подчеркнуть, что уравнение Эдера имеет наибольшее число подгоночных параметров относительно используемых уравнений, а это дает дополнительные преимущества с точки зрения качества аппроксимации модели к экспериментальным данным. То же самое можно сказать и про модели MWC и KNF. Однако если более сложная модель не давала бы преимуществ в описании, точнее, в аппроксимации экспериментальными данными, то следовало бы остановиться на более простой симметричной модели.

В итоге на вопрос, какая из моделей (или базы модели) ближе к реальному процессу оксигенации, можно ответить, оперируя методами квантовой химии, молекулярной динамики или способом, позволяющим оценить изменения на атомарном уровне организации макромолекулы с оценкой энергии взаимодействия ее структурных элементов.



Рис. 2. Дендрограмма (матрица расстояний) распределения некоторых моделей кривой диссоциации оксигемоглобина; коэффициент детерминации (в скобках после автора модели) и дистанция между объектами указаны в миллионных долях.

НОВАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ХИЛЛА

Уравнение Хилла с $h = 4$ позволяет корректно находить величину p_{50} (рис. 1, кривая 4). Однако, как уже отмечалось, наилучшее приближение в описании оксигенации наблюдалось при h меньше, чем число субъединиц n для этой макромолекулы (рис. 1, кривая 2). Так как показатель степени в уравнении однозначно связывали с числом молекул гембелка в его агрегатах, а потом и субъединиц в макромолекуле, то, разумеется, физический смысл величины h стал неочевиден.

Мы предприняли попытку снять это противоречие для h путем «разобщения» параметра, определяющего силу взаимодействия субъединиц и числа этих субъединиц n , которое имеет очевидный физический смысл [86].

В самой простой модели это выглядит следующим образом:

$$h = n - b, \quad (29)$$

где b – разность или «дефицит» между коэффициентом Хилла и числом субъединиц.

Величина b не сопряжена с n , является константой, но, в принципе, должна зависеть от n . Можно ввести коэффициент пропорциональности a для n , который обеспечивает сопряжение h с n .

$$h = an. \quad (30)$$

Однако для $h = 1$ a будет приобретать различные значения в зависимости от n , что затрудняет его интерпретацию.

Поэтому зависимость h от n лучше представить в виде уравнения $y = ax + b$:

$$h = \theta(n)(n - 1) + 1, \quad (31)$$

где $\theta(n)$ – вводимый нами «относительный коэффициент кооперативности» белка, состоящего из n субъединиц. Тогда $\theta(n) = 0$ указывает на отсутствие кооперативности, и коэффициент Хилла будет равен единице при любых n .

Число у коэффициента θ указывает на то, от какого числа субъединиц он был вычислен, что дает возможность легко находить h от $\theta(n)$ и наоборот (см. [86]).

Заметим, что подобный подход позволяет построить новую оценку кооперативности. По-видимому, явление кооперативности можно описывать при помощи разных подходов, и исследование их соотношения и связи с механизмами проявления аллостерии на молекулярном уровне – задача дальнейших исследований [87]. Мы полагаем, что подходы к описанию явления кооперативности и аллостерических эффектов, разработанные в применении к гемоглобину, могут быть использованы и для других адсорбционных систем (см., например, работу [21]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

История исследования связывания гемоглобином кислорода с точки зрения теории адсорбции и моделей, которые приводят к различным формальным описаниям этого явления, представляет собой научную ретроспективу, которая может быть полезна для исследователей, работающих в самых разных областях молекулярной биофизики. Здесь мы постарались показать эту историю под углом исследования феномена кооперативности, соединив описание классических

работ с некоторыми из наших исследований и обобщений. Отдельно следует выделить вклад в эту историю Л.А. Блюменфельда: его книга «Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода» стала для нас проводником в мир исследования этой удивительной «молекулярной машины», несущей кислород и дарующей жизнь [54]. Следует также отметить обзорную статью М. Перутца, которая подытожила его исследования оксигенации [88], а также книгу «Мне бы рассердить вас раньше» — эссе о науке, ученых и гуманизме [89].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность рецензентам за критический анализ рукописи и ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (тема 121052600299-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. Wyman and S. J. Gill, *Binding and Linkage: Functional Chemistry of Biological Macromolecules* (University Science Books, Mill Valley CA, 1990).
2. A. Y. Ben-Naim, *Cooperativity and regulation in biochemical processes* (Springer, Boston MA, 2001). DOI: 10.1007/978-1-4757-3302-0
3. В. Ф. Левченко, *Биосфера: этапы жизни (эволюция частей и целого)* (Свое издательство, СПб, 2012).
4. С.-L. Berthollet, *Essai de statique chimique* (Chez Firmin Didot, Paris, 1803).
5. P. Waage and C. M. Guldberg, *CM Forhandlinger: Videnskabs-Selskabet i Christiana* **35** (1864). DOI: 10.1021/ED063P1044
6. J. H. van't Hoff, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **10** (1), 669 (1877). DOI: 10.1002/CBER.187701001185
7. G. Hüfner, *Arch. ges. Physiol.* **31**, 28 (1890).
8. C. O'Sullivan and F. W. Tompson, *J. Chem. Society Trans.* **57**, 834 (1890). DOI: 10.1039/CT8905700834
9. A. V. Harcourt, *J. Chem. Society* **20**, 460 (1867). DOI: 10.1039/JS8672000460

10. E. Duclaux, *Traité de microbiologie: Diastases, toxines et venins*, Vol. II (Masson et Cie., Paris, 1899).
11. V. Henri, *Zeitschrift für physikalische Chemie* **39** (1), 194 (1902). DOI: 10.1515/zpch-1902-3912
12. A. J. Brown, *J. Chem. Society Trans.* **81**, 373 (1902). DOI: 10.1039/CT9028100373
13. L. Michaelis and M. L. Menten, *Biochem.* **49** (333–369), 352 (1913).
14. I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 2267 (1916). DOI: 10.1021/ja02268a002
15. J. Monod, *Annu. Rev. Microbiol.* **3** (1), 371 (1949). DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103
16. A. V. Hill, *J. Physiol.* **40**, i (1910).
17. E. Ising, *Beitrag zur theorie des ferro- und paramagnetismus* (Grefe & Tiedemann, Hamburg, 1924).
18. D. R. Hartree, In *Math. Proc. of the Cambridge Philosophical Society* (Cambridge University Press, Cambridge, 1928), pp. 111–132. DOI: 10.1017/S0305004100011920
19. R. H. Fowler, P. Kapitza, In *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character* **124** (793), 1 (1929). DOI: 10.1098/rspa.1929.0095
20. Yu. D. Nechipurenko and G. V. Gursky, *Bioph. Chem.* **24**, 195 (1986). DOI: 10.1016/0301-4622(86)85025-6
21. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т комп. исслед. (ИКИ), М. — Ижевск, 2015).
22. G. S. Adair, A. V. Bock, and H. Jr. Field, *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
23. T. Svedberg and R. Fåhræus, *J. Am. Chem. Soc.* **48** (2), 430 (1926). DOI: 10.1021/ja01413a019
24. J. T. Edsall, *J. Hist. Biol.* **5** (2), 205 (1972). DOI: 10.1007/BF00346659
25. A. Horovitz, *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **229** (1256), 315 (1986). <https://doi.org/10.1098/rspb.1986.0088>
26. H. Abeliovich, *Biophys. J.* **89** (1), 76 (2005). DOI: 10.1529/biophysj.105.060194
27. O. Rapp and O. Yifrach, *PLoS One* **12** (8), e0182871 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0182871
28. C. F. S. Bonafé, D. F. L. Neto, E. A. Martínez, et al., *Chem. Zvesti.* **74** (9), 2861 (2020). DOI: 10.1007/s11696-020-01125-1
29. R. H. Dahl, S. Taudorf, D. M. Bailey, et al., *Exp. Physiol.* **105** (7), 1063 (2020). DOI: 10.1113/EP088615
30. S. Srinivasan, F. H. Wagh, S. Idicula-Thomas, et al., *Biochim. Biophys. Acta. Biomembranes* **1862** (4), 183242 (2020). DOI: 10.1016/j.bbmem.2020.183242
31. A. M. Saleh and D. C. Batlle, *J. Clin. Invest.* **85** (6), 1734 (1990). DOI: 10.1172/JCI114629
32. A. G. Marangoni, *Enzyme kinetics: a modern approach* (John Wiley & Sons, 2003). DOI: 10.1002/0471267295
33. A. K. Bordbar, Z. Saadati, and N. Sohrabi, *Acta Biochim. Pol.* **51** (4), 963 (2004). DOI: 10.18388/abp.2004_3529
34. P. Messina, G. Prieto, V. Dodero, et al., *Biopolymers.* **79** (6), 300 (2005). DOI: 10.1002/bip.20353
35. L. Endrenyi, C. Fajsi, and F. H. Kwong, *Eur. J. Biochem.* **51** (2), 317 (1975). DOI: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb03931.x

36. H. P. Rang, Br. J. Pharmacol. **147** (S1), S9 (2006). DOI: 10.1038/sj.bjp.0706457
37. R. Cammack, T. Atwood, P. Campbell, et al., *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (Oxford University Press, 2008). DOI: 10.1093/acref/9780198529170.001.0001
38. A. Karlin, J. Theor. Biol. **16** (2), 306 (1967). DOI: 10.1016/0022-5193(67)90011-2
39. Ч. Кантор и П. Шиммель, *Биофизическая химия* (Мир, М., 1984).
40. S. A. Frank, Biol. Direct. **8** (1), 1 (2013). DOI: 10.1186/1745-6150-8-31
41. M. I. Stefan and N. Le Novere, PLoS Comput. Biol. **9** (6), e1003106 (2013). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003106
42. Z. Konkoli, Theor. Biol. Med. Model. **8** (1), 10 (2011). DOI: 10.1186/1742-4682-8-10
43. S. Goutelle, M. Maurin, F. Rougier, et al., Fundam. Clin. Pharmacol. **22** (6), 633 (2008). DOI: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x
44. J. Li, X. Zhu, M. Byrnes, et al., J. Biol. Chem. **268** (33), 24599 (1993). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)74508-6
45. H. Aramaki, H. Kabata, S. Takeda, et al., Genes Cells **16** (12), 1200 (2011). DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01563.x
46. S. Ding and F. Sachs, J. Gen. Physiol. **113** (5), 695 (1999). DOI: 10.1085/jgp.113.5.695
47. M. L. Coval, J. Biol. Chem. **245** (23), 6335 (1970). DOI: 10.1016/S0021-9258(18)62614-6
48. L. Pauling, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **21** (4), 186 (1935). DOI: 10.1073/pnas.21.4.186
49. I. M. Klotz, Arch. Biochem. Biophys. **9** 109 (1946).
50. I. Tyuma, K. Imai, and K. Shimizu, Biochemistry **12** (8), 1491 (1973). DOI: 10.1021/bi00732a004
51. T. Yonetani, S. I. Park, A. Tsuneshige, et al., J. Biol. Chem. **277** (37), 34508 (2002). DOI: 10.1074/jbc.M203135200
52. K. Imai, Biophys. Chem. **37** (1), 197 (1990). DOI: 10.1016/0301-4622(90)88019-O
53. J. López Fidalgo and M. M. Rodríguez-Hernández, Chemometr. Intell. Lab. Syst. **138** 133 (2014). DOI: 10.1016/J.CHEMOLAB.2014.07.014
54. Л. А. Блюменфельд, *Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода* (Сов. наука, М., 1957).
55. J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, et al., Nature **181** (4610), 662 (1958). DOI: 10.1038/181662a0
56. M. F. Perutz, M. G. Rossmann, A. F. Cullis, et al., Nature **185** (4711), 416 (1960). DOI: 10.1038/185416A0
57. M. F. Perutz, Nature **228** (5273), 726 (1970). DOI: 10.1038/228726A0
58. M. Perutz, Annu. Rev. Biochem. **48** (1), 327 (1979). DOI: 10.1146/ANNUREV.BI.48.070179.001551
59. D. W. Allen, K. F. Guthe, and J. Wyman Jr, J. Biol. Chem. **187** (1), 393 (1950). DOI: 10.1016/s0021-9258(19)50965-6
60. J. Wyman Jr and D. W. Allen, J. Polym. Sci. **7** (5), 499 (1951). DOI: 10.1002/POL.1951.120070506
61. S. R. Bernard, Bull. Math. Biophys. **22** (4), 391 (1960). DOI: 10.1007/BF02476569
62. A. V. Pardee, F. Jacob, and J. Monod, J. Mol. Biol. **1** (2), 165 (1959). DOI: 10.1016/S0022-2836(59)80045-0
63. F. Jacob and J. Monod, J. Mol. Biol. **3** (3), 318 (1961). DOI: 10.1016/S0022-2836(61)80072-7
64. J. Monod and F. Jacob, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **26**, 389 (1961). DOI: 10.1101/SQB.1961.026.01.048
65. J. Monod, F. Jacob, and F. Gros, Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Engl.) (21), 104 (1962).
66. J. Monod, J.-P. Changeux, and F. Jacob, J. Mol. Biol. **6** (4), 306 (1963). DOI: 10.1016/S0022-2836(63)80091-1
67. J. Monod, J. Wyman, and J.-P. Changeux, J. Mol. Biol. **12** (1), 88 (1965). DOI: 10.1016/S0022-2836(65)80285-6
68. M. I. Stefan, S. J. Edelstein, and N. Le Novère, BMC Syst. Biol. **3** (1), 68 (2009). DOI: 10.1186/1752-0509-3-68
69. S. J. Edelstein, J. Mol. Biol. **426** (1), 39 (2014). DOI: 10.1016/j.jmb.2013.09.010
70. A. Horovitz and T. Mondal, J. Phys. Chem. B. **125** (1), 70 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c09351
71. J.-H. S. Hofmeyr, and H. Cornish-Bowden, Bioinformatics. **13** (4), 377 (1997). DOI: 10.1093/BIOINFORMATICS/13.4.377
72. J. N. Weiss, FASEB J. **11** (11), 835 (1997). DOI: 10.1096/fasebj.11.11.9285481
73. N. Kaihnsa, Y. Ren, M. Safey El Din, et al., J. Math. Biol. **81** (4), 1169 (2020). DOI: 10.1007/s00285-020-01540-8
74. D. E. Koshland Jr, G. Némethy, and D. Filmer, Biochemistry **5** (1), 365 (1966). DOI: 10.1021/BI00865A047
75. W. A. Eaton, E. R. Henry, J. Hofrichter, et al., Nat. Struct. Biol. **6** (4), 351 (1999). DOI: 10.1038/7586
76. G. Weber, Nature **300** (5893), 603 (1982). DOI: 10.1038/300603a0
77. L. Lee, Biophys. Physicobiol. **16**, 490 (2019). DOI: 10.2142/biophysico.16.0_490
78. T. R. Chay and C. Ho, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70** (12), 3914 (1973). DOI: 10.1073/PNAS.70.12.3914
79. A. Cornish-Bowden, FEBS J. **281** (2), 621 (2014). DOI: 10.1111/febs.12469
80. И. В. Высочина, Биофизика. **8**, 361 (1963).
81. П. А. Подрабинек и И. И. Каменский, Молекуляр. биология **2**, 120 (1968).
82. Ю. А. Кисляков, *Математическое моделирование кровообращения и газообмена в мозгу* (Наука. Ленингр. отд-ние, Л., 1975).
83. М. А. Ханин, Н. Л. Дорфман, И. Б. Бухаров и др., *Экстремальные принципы в биологии и физиологии* (Наука, М., 1978).
84. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, В. Ю. Сулин и др., Биофизика **66** (6) 1065 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106003X
85. R. M. Winslow, M. Swenberg, R. L. Berger, et al., J. Biol. Chem. **252**, 2331 (1977). DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40559-X
86. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов и Ю. Д. Нечипуренко, Биофизика **67** (2), 229 (2022). DOI: 10.31857/S000630292202003X
87. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов и Ю. Д. Нечипуренко, Биофизика **67** (3), 444 (2022).
88. M. F. Perutz, Q. Rev. Biophys. **22** (2), 139 (1989). DOI: 10.1017/s0033583500003826
89. M. F. Perutz, *I Wish I'd Made You Angry Earlier: Essays on Science, Scientists, and Humanity* (Oxford University Press, Oxford, 2002).

Cooperative Oxygen Binding by Hemoglobin as a General Model in Molecular Biophysics

I.A. Lavrinenko*, G.A. Vashanov*, A.S. Buchelnikov**, and Yu.D. Nechipurenko**, ***

*Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia

**Sevastopol State University, Universitetskaya ul. 33, Sevastopol, 299053 Russia

***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

The study of hemoglobin and the description of its oxygenation, the thermodynamic and mathematical models developed for these purposes represent a very great advance in biophysics, and the proposed equations, in particular the Hill equation, has had an impact on the development of science in different fields. Hemoglobin and its allosteric mechanism of regulation of the binding of oxygen and other ligands served as a model for a huge number of molecular biological systems. The review focuses on the formal description of oxygen binding by hemoglobin and considers the main mathematical models developed in this area. The evolution of binding models can be seen dating from the approaches proposed by Hill, Adair, Monod–Wyman–Changeux and Koshland–Némethy–Filmer to the modern views. Particular attention is paid to different formal approaches and ideas to the description of oxygenation as a phenomenon of physical adsorption.

Keywords: hemoglobin, cooperativity and allostery, Hill equation, Adair equation, Bernard equation, Monod–Wyman–Changeux model, Koshland–Némethy–Filmer model, symmetric and sequential models, adsorption models