

УДК 577.31; 612.11

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КООПЕРАТИВНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГЕМОГЛОБИНА С КИСЛОРОДОМ

С. В. Булярский¹, А. С. Насибов, В. В. Светухин¹, Д. Я. Вострецов¹

В данной работе предложена термодинамическая модель взаимодействия гемоглобина с кислородом, в основу которой положен метод минимизации свободной энергии Гиббса. Модель учитывает конформное взаимодействие между молекулами кислорода в гемоглобине, взаимодействие молекул кислорода с протонами водорода (эффект Бора), влияние температуры, давления кислорода, водорода, углекислого газа. С помощью предложенной модели описан ряд экспериментальных данных, что позволило найти термодинамические параметры модели.

Ключевые слова: гемоглобин, кислород, кривая оксигенации, свободная энергия Гиббса, конформационное взаимодействие, эффект Бора.

Функциональное назначение гемоглобина заключается в способности транспортировать кислород и углекислый газ – таким образом, он составляет молекулярную основу дыхательной функции крови. Одним из показателей взаимодействия гемоглобина с кислородом является кривая оксигенации.

Исследованием кривой оксигенации гемоглобина занимаются уже более 100 лет, и по этой теме опубликовано большое число работ [1]. Предпринимались попытки описания данной кривой с помощью математических методов [2]. Однако до сих пор нет удовлетворительной модели, описывающей все закономерности изменения данной кривой с изменением набора физиологических параметров организма.

Гемоглобин способен взаимодействовать не только с O_2 , CO_2 или CO , но и со многими другими веществами. Все они носят название лигандов. При этом гемоглобин

¹Ульяновский государственный университет.

изменяет свою пространственную конфигурацию – конформацию, отчего существенно изменяются физико-химические и функциональные свойства молекулы [1].

Для расчетов воспользуемся базовой моделью дефектообразования в конденсированных средах, описанной в работах С. В. Булярского [3, 4]. Примем следующую модель взаимодействия гемоглобина с кислородом. Каждая молекула гемоглобина состоит из четырех мономеров, мономер имеет гем и глобин. Гем может находиться в нескольких состояниях, а именно: к гему присоединен кислород; к гему присоединен углекислый газ либо атом железа может быть свободен. Глобин состоит из последовательности аминокислот. В зависимости от кислотности среды глобин может присоединять или отдавать ион водорода.

Обозначим все возможные состояния гемоглобина следующей системой индексов: $\{i, j, l_a, l_d\}$. Численное значение индекса i соответствует количеству присоединенных молекул кислорода, j – количеству молекул углекислого газа, l_a, l_d – число ионов водорода, участвующих в донорной и акцепторной связи соответственно.

Обозначим через $N_{l_a l_d}^{ij}$ – количество молекул гемоглобина, находящихся в соответствующем состоянии. Свободную энергию системы можно записать в виде:

$$G = G^{ext}(N_{O_2}, N_{CO_2}, N_H, N_{OH}) + \sum_{i,j,l_a,l_d} g_{l_a l_d}^{ij} N_{l_a l_d}^{ij} - kT \ln W, \quad (1)$$

где $i, j = 0..4$, $i + j \leq 4$, $l_a, l_d = 0..4$, $G^{ext}(N_{O_2}, N_{CO_2}, N_H, N_{OH})$ – свободная энергия окружающей среды гемоглобина, $g_{l_a l_d}^{ij}$ – парциальная свободная энергия соответствующего состояния, $kT \ln W$ – конфигурационная энтропия данной системы, где W записывается следующим образом:

$$W = \frac{N_{Hb}^{tot}!}{\prod_{i,j,l_a,l_d} N_{l_a l_d}^{ij}!} \cdot \prod_{i,j,l_a,l_d} \left(\frac{4!}{i!j!(4-i-j)!} \right)^{N_{l_a l_d}^{ij}} \times \\ \times \prod_{i,j,l_a,l_d} \left(\frac{4!}{l_a!(4-l_a)!} \right)^{N_{l_a l_d}^{ij}} \cdot \prod_{i,j,l_a,l_d} \left(\frac{4!}{l_d!(4-l_d)!} \right)^{N_{l_a l_d}^{ij}}. \quad (2)$$

Энергия соответствующего состояния определяется следующим образом:

$$g_{l_a l_d}^{ij} = g_{O_2} i + W_{O_2} i(i-1) + g_{CO_2} j + g_{H_a} l_a + g_{H_d} l_d + \Omega_a M_{i l_a} + \Omega_d M_{i l_d}, \quad (3)$$

где g_{O_2} – парциальная свободная энергия связи кислорода, W_{O_2} – константа конформационного взаимодействия кислорода; g_{CO_2} – парциальная свободная энергия связи

углекислого газа. За взаимодействие водорода с аминокислотными остатками отвечают величины g_{Ha} , g_{Hd} (это и есть энергии связи протонов водорода с белком глобина), то есть за эффект Бора в исследуемом диапазоне pH отвечают как минимум две аминокислотные группы. Присоединение протонов водорода к соответствующим аминокислотным остаткам влечет изменение конформации глобина, а соответственно и изменение энергии присоединения молекул кислорода. Это изменение составляет $\Omega_a = -0.030$ эВ и $\Omega_d = -0.070$ эВ для акцепторной и донорной связи соответственно. M_{il_a} , M_{il_d} – количество взаимодействующих посредством изменения конформации пар типа кислород – водород для акцепторной и донорной связей. Нелинейная зависимость выражения (3) от i соответствует предположению о конформационном взаимодействии молекул кислорода.

Минимизация свободной энергии (1) проводится методом неопределенных множителей Лагранжа с учетом следующих законов сохранения гемоглобина, кислорода, углекислого газа, водорода и заряда:

$$\varphi_1 = N_{Hb}^{tot} - \sum_{i,j,l_a,l_d} N_{l_a l_d}^{ij} = 0; \quad (4)$$

$$\varphi_2 = N_{O_2}^{tot} - N_{O_2} - \sum_{i,j,l_a,l_d} i N_{l_a l_d}^{ij} = 0; \quad (5)$$

$$\varphi_3 = N_{CO_2}^{tot} - N_{CO_2} - \sum_{i,j,l_a,l_d} j N_{l_a l_d}^{ij} = 0; \quad (6)$$

$$\varphi_4 = N_H^{tot} - N_H - \sum_{i,j,l_a,l_d} l_a N_{l_a l_d}^{ij} - \sum_{i,j,l_a,l_d} l_d N_{l_a l_d}^{ij} = 0; \quad (7)$$

$$\varphi_5 = N_H - N_{OH} + \sum_{i,j,l_a,l_d} l_a N_{l_a l_d}^{ij} - \sum_{i,j,l_a,l_d} l_d N_{l_a l_d}^{ij} = 0, \quad (8)$$

где N_{Hb}^{tot} , $N_{O_2}^{tot}$, $N_{CO_2}^{tot}$, N_H^{tot} – общее число гемоглобина, кислорода, углекислого газа и водорода. N_{O_2} , N_{CO_2} , N_H – это количество кислорода, углекислого газа и водорода во внешней фазе. N_{OH} – это заряд, который создают OH -группы.

Минимизируемый функционал будет выглядеть следующим образом:

$$\Phi = G + \lambda_1 \varphi_1 + \lambda_2 \varphi_2 + \lambda_3 \varphi_3 + \lambda_4 \varphi_4 + \lambda_5 \varphi_5, \quad (9)$$

где $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4, \lambda_5$ – неопределенные множители Лагранжа. Минимум свободной энергии (1) с учетом законов сохранения (4) – (9) соответствует следующим условиям:

$$\frac{d\Phi}{dN_{l_a l_d}^{ij}} = g_{l_a l_d}^{ij} - kT \ln \frac{4! \cdot 4! \cdot 4!}{j! j! (4-i-j)! l_a! (4-l_a)! l_d! (4-l_d)!} - \lambda_1 - i\lambda_2 - j\lambda_3 - (l_a + l_d)\lambda_4 + (l_d - l_a)\lambda_5 - kT \ln N_{l_a l_d}^{ij} = 0; \quad (10)$$

$$\frac{d\Phi}{dN_{O_2}} = \frac{dG^{ext}}{dN_{O_2}} - \lambda_2 = 0. \quad (11)$$

Остальные условия для N_{CO_2} , N_H , N_{OH} записываются аналогично. Из термодинамики известно, что производная $\frac{\partial G}{\partial N}$ есть химический потенциал:

$$\frac{\partial G^{ext}}{\partial N_X} = \mu_X^0 + kT \ln a_X \quad (X = O_2, CO_2, H, OH), \quad (12)$$

где $\mu_{O_2}^0$, $\mu_{CO_2}^0$, μ_H^0 , μ_{OH}^0 – стандартный химический потенциал для кислорода, углекислого газа, водорода, OH -группы соответственно, a_{O_2} , a_{CO_2} , a_H , a_{OH} – активность атомов кислорода, углекислого газа и водорода соответственно.

Из закона сохранения кислорода (5) и из (11) находим

$$\lambda_2 = \mu_{O_2}^0 + kT \ln a_{O_2}. \quad (13)$$

λ_3 , λ_4 , λ_5 находим аналогично.

Из закона сохранения гемоглобина находим λ_1 :

$$\exp\left(\frac{\lambda_1}{kT}\right) = \frac{N^{tot}}{\sum_{jkl_a l_d} \frac{4! \cdot 4! \cdot 4! (a_{O_2})^i (a_{CO_2})^j (a_H)^{l_a + l_d} (a_{OH})^{2l_a}}{i! j! (4-i-j)! l_a! (4-l_a)! l_d! (4-l_d)!} \exp\left(-\frac{\Delta g_{l_a l_d}^{ij}}{kT}\right)}. \quad (14)$$

Подставляя полученное выражение в (10) с учетом значений λ_2 , λ_3 , λ_4 , λ_5 , получаем выражение для описания состояния макромолекулы гемоглобина:

$$N_{l_a l_d}^{ij} = \frac{N^{tot} \frac{4! \cdot 4! \cdot 4! (a_{O_2})^i (a_{CO_2})^j (a_H)^{l_a + l_d} (a_{OH})^{2l_a}}{i! j! (4-i-j)! l_a! (4-l_a)! l_d! (4-l_d)!} \exp\left(-\frac{\Delta g_{l_a l_d}^{ij}}{kT}\right)}{\sum_{j l_a l_d} \frac{4! \cdot 4! \cdot 4! (a_{O_2})^i (a_{CO_2})^j (a_H)^{l_a + l_d} (a_{OH})^{2l_a}}{i! j! (4-i-j)! l_a! (4-l_a)! l_d! (4-l_d)!} \exp\left(-\frac{\Delta g_{l_a l_d}^{ij}}{kT}\right)}, \quad (15)$$

где

$$\Delta g_{l_a l_d}^{ij} = g_{O_2} i + W_{O_2} i(i-1) + g_{CO_2} j + g_{H} l_a + g_{H} l_d +$$

$$+\Omega_a M_{il_a} + \Omega_d M_{il_d} - i\mu_{O_2}^0 - j\mu_{CO_2}^0 - (l_a + l_d)\mu_H^0 - 2l_a\mu_{OH}^0. \quad (16)$$

Степень насыщения молекул гемоглобина кислородом равна отношению количества молекул, содержащих молекулы кислорода к общему числу молекул гемоглобина:

$$Hb = \frac{\sum_{i,j,l_a,l_d} i N_{l_a l_d}^{ij}}{4 \sum_{i,j,l_a,l_d} N_{l_a l_d}^{ij}} \cdot 100\%. \quad (17)$$

Данная величина измеряется в процентах. Подставляя в полученное выражение $N_{l_a l_d}^{ij}$, получаем формулу, с помощью которой будем описывать экспериментальные данные – зависимость степени насыщения гемоглобина кислородом от таких факторов как парциальное давление кислорода, кислотность, температура и т.д.

$$Hb = \frac{\sum_{i,j,l_a,l_d} i \frac{(a_{O_2})^i (a_{CO_2})^j (a_H)^{l_a+l_d} (a_{OH})^{2l_a}}{i!j!(4-i-j)!l_a!(4-l_a)!l_d!(4-l_d)!} \cdot \exp\left(-\frac{g_{l_a l_d}^{ij}}{kT}\right)}{4 \sum_{i,j,l_a,l_d} \frac{(a_{O_2})^i (a_{CO_2})^j (a_H)^{l_a+l_d} (a_{OH})^{2l_a}}{i!j!(4-i-j)!l_a!(4-l_a)!l_d!(4-l_d)!} \cdot \exp\left(-\frac{g_{l_a l_d}^{ij}}{kT}\right)} \cdot 100\%. \quad (18)$$

Для нахождения параметров модели результаты расчетов сопоставлялись с экспериментальными значениями стандартной кривой оксигенации гемоглобина человека (рис. 1) и данными по эффекту Бора для разных температур (рис. 2), где P_{50} – давление кислорода при 50-процентном насыщении гемоглобина кислородом, pH – кислотность плазмы крови.

При аппроксимации экспериментальных данных формулой (18) были получены следующие термодинамические параметры модели: $g_{O_2} = -0.58$ эВ (экспериментальные данные калориметрических измерений $g_{O_2} = -0.498... - 0.581$ эВ [2]), $W_{O_2} = -0.057$ эВ, $g_{H_a} = -0.30$ эВ, $g_{H_d} = -0.50$ эВ – энергии присоединения протонов; $\Omega_{H_a} = -0.030$ эВ, $\Omega_{H_d} = -0.070$ эВ – константы взаимодействия протонов с кислородом. $g_{CO_2} = -0.83$ эВ взята из работы [2]. При этом, значения g_{O_2} , W_{O_2} получены при аппроксимации кривой оксигенации, а g_{H_a} , g_{H_d} , Ω_{H_a} , Ω_{H_d} – при обработке экспериментальных данных по эффекту Бора.

Количество параметров модели отражает количество тех факторов, которые влияют на процесс взаимодействия кислорода с гемоглобином. Найденные из сопоставления экспериментальных данных и расчетов параметры модели достаточно реалистичны и

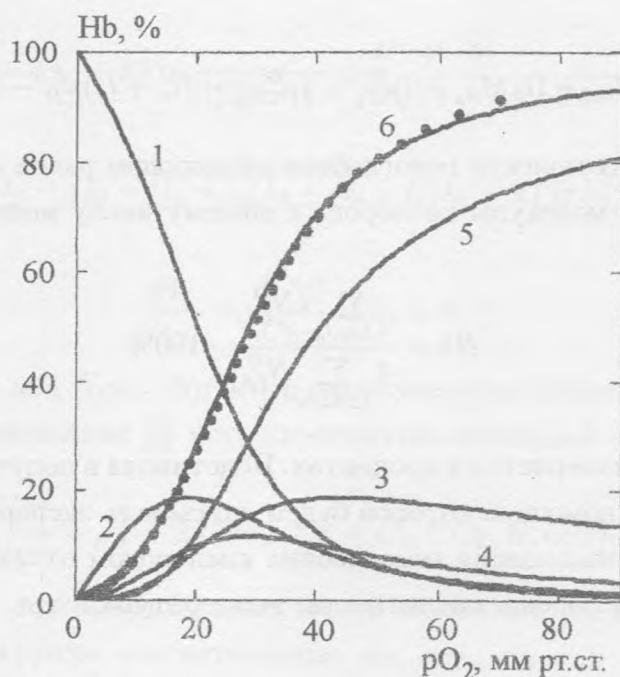


Рис. 1. Доля молекул гемоглобина с разной степенью заполнения в зависимости от давления кислорода: 1 – молекулы без кислорода, 2 – с одним атомом кислорода, 3 – с двумя атомами кислорода, 4 – с тремя атомами кислорода, 5 – полностью заполненный кислородом гемоглобин, 6 – степень заполнения гемоглобина кислородом (точки – эксперимент [5], линия – модельная кривая).

хорошо соотносятся с экспериментальными данными других авторов. Имеющихся экспериментальных данных вполне достаточно для нахождения параметров модели. Окончательно опровергнуть или подтвердить предложенную модель можно путем описания большего числа экспериментальных данных.

Известно, что большинство моделей взаимодействия гемоглобина с кислородом (Моно, Кошланда и др.) могут быть приведены к уравнению Эйндера [1, 2]. Полученное в данной работе уравнение (18) также имеет вид уравнения Эйндера, но в отличие от моделей других исследователей полученные нами выражения зависят от температуры, давления углекислого газа и кислотности.

На рис. 1 показано распределение гемоглобина с разной степенью заполнения кислородом от парциального давления кислорода. В предложенной зависимости хорошо видно действие кооперативного эффекта. В области малых давлений кислорода почти весь гемоглобин освобожден от атомов кислорода. С увеличением давления кислорода число заполненных молекул гемоглобина резко увеличивается. При этом число моле-

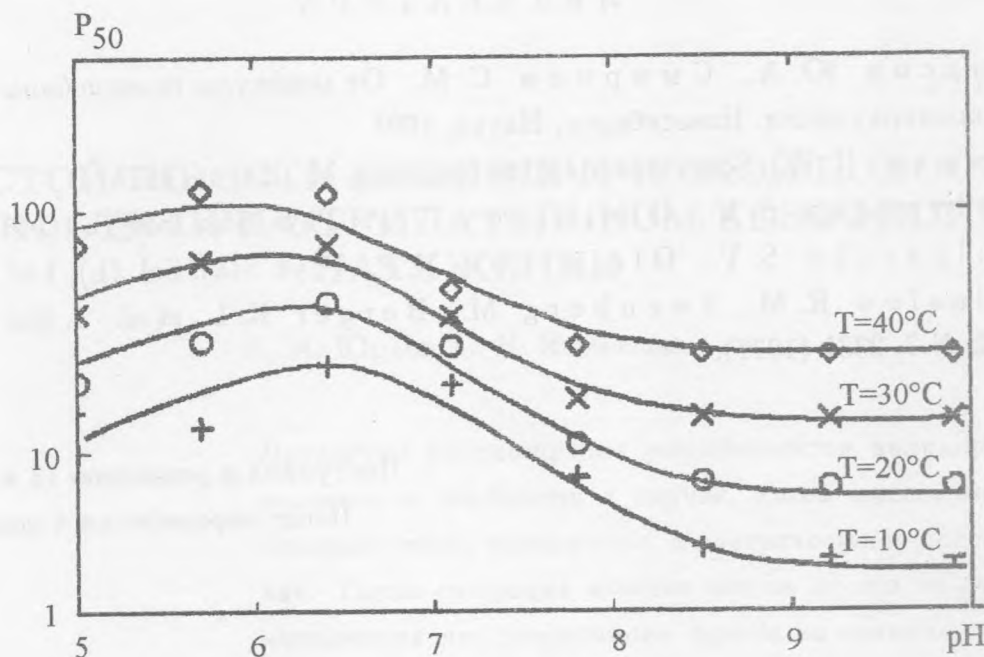


Рис. 2. Эффект Бора в гемоглобине человека при различных температурах. Зависимость P_{50} (давления, необходимого для 50-процентного заполнения кислородом гемоглобина) от кислотности. Символами представлены экспериментальные данные, сплошными линиями — результаты моделирования.

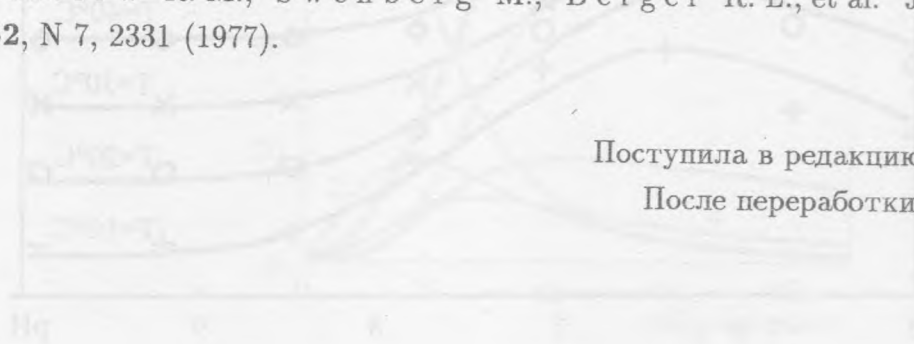
кул полностью заполненного гемоглобина намного больше, чем заполненного частично. Данный факт объясняется тем, что гемоглобин, содержащий хотя бы один атом кислорода, гораздо эффективнее присоединяет остальные. В этом и состоит сущность кооперативного эффекта.

Таким образом, в данной работе предложена термодинамическая модель взаимодействия гемоглобина с кислородом, на основе метода минимизации свободной энергии Гиббса учитывающая конформное взаимодействие между молекулами кислорода в гемоглобине, влияние температуры, давление кислорода, водорода, углекислого газа. На основе предложенной модели описан ряд экспериментальных данных, что позволило найти термодинамические параметры модели. Предложенная модель может быть использована при моделировании дыхания человека в экстремальных условиях (гипоксия, экстремальные физические нагрузки, техногенная среда и др.).

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства образования РФ N А03-2.9-911 и президентской программы "Молодые доктора наук РФ" (МД-4098.2004.2).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Власов Ю. А., Смирнов С. М. От молекулы гемоглобина – к системе микроциркуляции. Новосибирск, Наука, 1993.
- [2] Иржак Л. И. Гемоглобины и их свойства. М., Наука, 1975.
- [3] Bulyarsky S. V., Oleinikov V. P. Phys. Stat. Sol. (b), **141**, K7 (1987).
- [4] Bulyarsky S. V., Oleinikov V. P. Phys. Stat. Sol. (b), **146**, 439 (1988).
- [5] Winslow R. M., Swenberg M., Berger R. L., et al. J. Biol. Chemistry, **252**, N 7, 2331 (1977).



Поступила в редакцию 13 июля 2004 г.

После переработки 4 ноября 2004 г.