

НОВАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ХИЛЛА

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

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

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

E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 27.12.2021 г.

После доработки 04.02.2022 г.

Принята к публикации 07.02.2022 г.

Предложена модификация уравнения Хилла, описывающего процесс кооперативного связывания макромолекулой лиганда. Вводимый нами в это уравнение параметр «относительный коэффициент кооперативности» позволяет обеспечить сопряжение коэффициента Хилла с числом взаимодействующих субъединиц в олигомере. Это позволяет прояснить физический смысл данного коэффициента и объясняет природу его нецелочисленных значений. Нормирование относительного коэффициента кооперативности дает дополнительную возможность сопоставлять такие коэффициенты для олигомеров с различным числом протомеров. Предлагаемый относительный коэффициент кооперативности может быть полезным при решении широкого круга задач, связанных с описанием согласованного взаимодействия элементов на всех уровнях пространственной организации белков, нуклеиновых кислот, их комплексов, а также такого взаимодействия для рецепторов и их медиаторов.

Ключевые слова: кооперативное связывание лигандов, изотерма адсорбции, кривая диссоциации оксигемоглобина, уравнение Хилла, коэффициент Хилла, относительный коэффициент кооперативности

DOI: 10.31857/S000630292202003X

Обратимое связывание кислорода гемоглобином является необходимым условием функционирования кислородтранспортной системы крови [1, 2]. Зависимость степени оксигенации гембелка от парциального давления этого газа графически представляется в виде кривой диссоциации оксигемоглобина [3, 4]. Построенные по ограниченному дискретному набору экспериментальных данных кривые диссоциации оксигемоглобина могут быть в дальнейшем аппроксимированы рядом математических функций [5]. Это необходимо, прежде всего, для нахождения величин полунасыщения гемоглобина кислородом (p_{50}) [6, 7], зарядного напряжения (p_{95}) [8], а также значений параметров, характеризующих уровень оксигенации в артериальной (SaO_2) [9, 10] или венозной (SvO_2) крови [11, 12].

Разработанные к настоящему времени математические модели оксигенации позволяют связывать коэффициенты уравнений с некоторыми параметрами кислородсвязывающих свойств гембелка [13–15]. Для наиболее известных моделей связывания кислорода гемоглобином, построенных на степенных и экспоненциальных зависимостях, нами ранее была проведена оценка аппроксимирующей способности [16].

Однако высокие значения коэффициентов достоверности аппроксимации (r^2) не являются самодостаточными и определяющими при подборе моделей оксигенации. Это объясняется тем, что высокие значения r^2 также можно достичь и посредством интерполирующих полиномов высших порядков, например Лагранжа, Ньютона, Фурье, Чебышёва и др., которые в данном случае не имеют физического смысла [17–19].

Поэтому, несмотря на приближенное описание кислородсвязывающих свойств гемоглобина, уравнение Хилла не утратило своей актуальности в силу минимума необходимых априорных знаний процесса оксигенации [20] (оно широко применяется и для описания других кооперативных процессов). Главным параметром в уравнении Хилла является одноименный коэффициент (h), с помощью которого можно охарактеризовать степень кооперативности процесса оксигенации. Однако несоответствие числа взаимодействующих субъединиц тетрамера (n) нецелочисленному значению h затрудняет понимание физического смысла этого коэффициента [21–23].

В настоящей работе предпринята попытка снять это кажущееся противоречие путем введения в уравнение сопрягающего коэффициента,

проясняющего физический смысл этого уравнения. Заметим, что переосмысление интерпретации коэффициента Хилла может оказаться важным при описании взаимодействия «лиганд–рецептор» [24], а также других кооперативных систем.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования была использована модель Хилла и набор экспериментальных данных, полученных в работе [25]. Оптимизация параметров модели проведена методом наименьших квадратов [26]. Необходимые вычисления выполнены с помощью пакета программ MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенное Г. Гюфнером в 1890 г. уравнение оксигенации, выведенное из закона действующих масс, не могло описать S-образность кривой диссоциации оксигемоглобина [27]. Поэтому А. Хилл в 1910 г. предложил рассматривать процесс оксигенации как взаимодействие лиганда с макромолекулярным ассоциатом белка, т.е. как химическую реакцию n -го порядка [13]:



$$y = \frac{p^n}{p_{50}^n + p^n}, \quad (2)$$

где Hb — дезоксигемоглобин, O_2 — кислород, HbO_2 — оксигемоглобин, y — степень насыщения гемоглобина кислородом, p — парциальное давление кислорода, p_{50} — давление кислорода при $y = 0.5$ (50% насыщение лигандом) и n — степень агрегации гемоглобина (порядок реакции по лиганду, совпадающий со стехиометрическим коэффициентом этой реакции при выполнении закона действующих масс).

Так как при анализе данных показатель степени n обычно принимал нецелочисленные значения, то физический смысл данного уравнения оказался неясным. Чтобы объяснить нецелочисленные значения своего параметра, Хилл предложил рассматривать n как некоторое усреднение по множеству молекулярных ассоциатов гембелка с различной степенью их агрегации [13, 28].

Однако в 1925 г. Г. Эдером было показано, что молекула гемоглобина представляет собой тетрамер [14]. Хотя это не противоречило представлениям о существовании молекулярных ассоциатов, но и не объясняло, почему коэффициент этого уравнения приобретает значения меньше четырех единиц. Такое несоответствие снова привело к противоречиям в физической трактовке модели Хилла [21–23].

Можно представить пул молекул гемоглобина в виде набора димерных и тетрамерных форм с различной весовой долей, аналогично ассоциатам гембелка. Однако в эритроцитах данный белок находится главным образом в виде тетрамера (99.3–99.4%), что следует из расчетов по данным референтных значений концентрации гемоглобина в клетке (4300–5500 мкмоль/л) [29] и константы диссоциации ($K_{4,2} = 0.2$ мкмоль/л) при нормальном атмосферном давлении, pH и температуре 7.0 и 37°C соответственно [30]. Из этого следует, что коэффициент Хилла, равный 2.52 (и вычисленный нами по известным данным [25]) должен соответствовать доле тетрамеров 25.9%. Это возможно при концентрации белка 0.1 мкмоль/л и явно противоречит приведенным выше значениям.

Тем не менее уравнение Хилла получило широкое распространение, так как наряду с простой вычисления и хорошей аппроксимирующей способностью [31] позволяет непосредственно находить величину p_{50} , а одноименный коэффициент этого уравнения (в аналогичных публикациях обозначаемый как n_H [32, 33], h [34, 35] или некоторыми другими символами и их сочетаниями [36, 37]) дает некоторую оценку кооперативности составляющих его субъединиц.

Для того чтобы снять противоречие между способностью уравнения Хилла при минимуме параметров хорошо аппроксимировать экспериментальные данные и несоответствием показателя степени этого уравнения целочисленному значению [38], мы предлагаем представить коэффициент Хилла h , как произведение числа взаимодействующих структурных элементов n (в частности, субъединиц гембелка) на коэффициент пропорциональности a , отождествляемый со степенью кооперативного взаимодействия этих элементов:

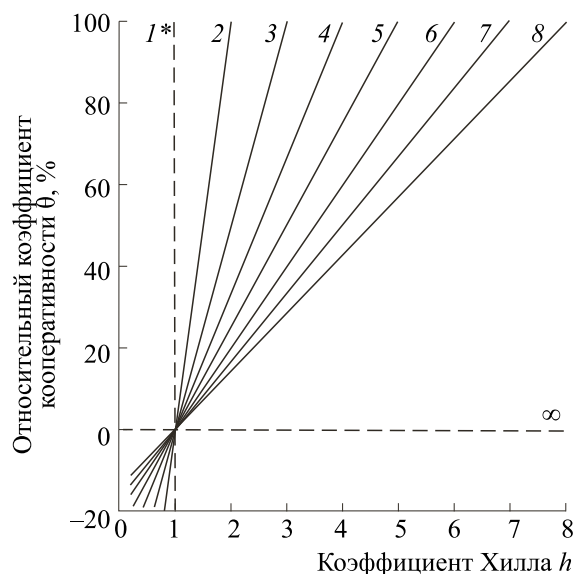
$$y = \frac{p^{an}}{p_{50}^{an} + p^{an}}. \quad (3)$$

Однако при отсутствии кооперативности, которая характеризуется коэффициентом Хилла h равным единице, коэффициент пропорциональности a будет принимать различные значения, зависящие от числа субъединиц n , что затрудняет интерпретацию последнего.

Мы предлагаем произведение an в уравнении Хилла привести к следующему виду:

$$h = an = \theta(n)(n - 1) + 1, \quad (4)$$

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 .



Зависимость относительного коэффициента кооперативности от коэффициента Хилла для макромолекулы, состоящей из n субъединиц. Для молекулы гемоглобина актуальными являются значения $n = 2$ и 4 . Обозначения: номера линейных моделей соответствуют количеству субъединиц в составе макромолекулы. Примечание: для $n = 1$ — значение $\theta(n)$ не определено, для $n \rightarrow \infty$ и при $h = \text{const}$ получаем $\theta(n) \rightarrow 0$.

В конечном варианте в нашей записи уравнение Хилла (при $p > 0$) будет выглядеть следующим образом:

$$y = \frac{p^{\theta(n)(n-1)+1}}{p_{50}^{\theta(n)(n-1)+1} + p^{\theta(n)(n-1)+1}} = \left(1 + \left(\frac{p_{50}}{p} \right)^{\theta(n)(n-1)+1} \right)^{-1}. \quad (5)$$

Для проверки адекватности данной математической модели экспериментальным данным [25] использовали критерий Фишера. Результаты анализа однофакторной регрессии показали следующее: $F_{\text{расч}} (103905.36) \gg F_{\text{табл}} (3.99, \alpha = 0.05)$, при

$r^2 = 99.94\%$, что демонстрирует приведенную модель статистически значимой.

При помощи этого уравнения по приведенным данным для тетрамера гемоглобина мы вычислили значения величин p_{50} и $\theta(4)$, которые составили 28.8 мм рт. ст. и 0.507 соответственно. Таким образом, этот коэффициент может быть использован для описания степени взаимодействия между субъединицами в составе олигомера. Он показывает, насколько «необходимо» взаимодействовать протомерам для текущего «выполнения» макромолекулой своей функциональной задачи, исходя из максимальной возможности, определяемой числом ее субъединиц.

Важным применением $\theta(n)$, на наш взгляд, также может быть сопоставление степени кооперативности, например, для димерных и тетрамерных форм гемоглобина, учитывающее количество взаимодействующих субъединиц. Если диссоциация тетрамера гембелка на его димеры приведет к ожидаемому уменьшению коэффициента Хилла, то по нормированному значению $\theta(n)$ степень кооперативности может остаться прежней. В общем виде нормированное значение $\theta(n)$ можно получить путем приведения к димерной, тетрамерной или любой другой форме белка исходя из зависимостей, представленных на рисунке. Также следует отметить граничные условия. Для молекулы, состоящей из одной субъединицы ($n = 1$), значение $\theta(n)$ не определено (пунктирная линия 1*), так как в этом случае кооперативность отсутствует как физическое явление. Для $\theta(n) = 0$ коэффициент Хилла всегда будет равен единице при любых $n > 1$ (см. рисунок).

Для тех случаев, когда раствор гемоглобина является смесью димерных и тетрамерных форм белка с усредненной величиной n , значение $\theta(n)$ можно получить исходя из вычисленного значения $\bar{n}$ приведенного диапазона (таблица).

Доля тетрамерных форм оксигемоглобина (χ) и среднее арифметическое число субъединиц ($\bar{n}$) в составе макромолекулы в зависимости от концентрации белка (C)

C , моль/л	χ , %	$\bar{n}$
10^{-9}	0.50	2.010
10^{-8}	4.55	2.091
10^{-7}	26.79	2.536
10^{-6}	64.17	3.283
10^{-5}	86.82	3.736
10^{-4}	95.63	3.913
10^{-3}	98.60	3.972
10^{-2}	99.55	3.991

Примечание. Значения приведены для температуры 37°C, pH 7.0 и нормального атмосферного давления.

Еще одним важным применением вводимой нами в рассмотрение величины $\theta(n)$ может быть анализ степени кооперативных взаимодействий гибридов валентности, в частности, гетеротетрамеров гемоглобина, как комбинации α -, β - и других типов субъединиц с различной степенью окисления гемового железа ($2^+/3^+$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена модификация уравнения Хилла, описывающего процесс кооперативного связывания лиганда макромолекулой на примере оксигенации гемоглобина. Мы ввели в рассмотрение параметр $\theta(n)$ — относительный коэффициент кооперативности, который позволяет обеспечить сопряжение вычисляемого коэффициента Хилла с числом взаимодействующих субъединиц в олигомере n и устраняет проблему физического смысла этого коэффициента — объясняет природу его нецелочисленных значений. Нормировка относительного коэффициента кооперативности дает дополнительную возможность сопоставлять эти коэффициенты для олигомеров с разными значениями n .

Таким образом, $\theta(n)$ может быть полезным при решении широкого круга задач, связанных с кооперативными взаимодействиями [39–41]. Разработанный нами подход может быть применен для описания изотерм адсорбции (кривых связывания) лигандов разного рода с макромолекулами [42–45], в частности, взаимодействия рецепторов и их медиаторов [46, 47].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность А. Бучельникову и А. Заседателю за плодотворные дискуссии и полезные замечания, а также 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. R. F. Schmidt and G. Thews, *Human Physiology* (Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 2013).
2. W. F. Boron and E. L. Boulpaep, *Medical Physiology* (Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 2017).
3. R. N. Sladen, *Int. Anesthesiol. Clin.* **19** (3), 39 (1981). DOI: 10.1097/00004311-198119030-00006
4. E. Antonini, *Crit. Care Med.* **7** (360), 367 (1979).
5. S. M. Gadrey, C. E. Lau, R. Clay, et al., *Physiol. Meas.* **40** (11), 115008 (2019). DOI: 10.1088/1361-6579/ab5154
6. Z. Chu, Y. Wang, G. You, et al., *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **48** (1), 867 (2020). DOI: 10.1080/21691401.2020.1770272
7. R. M. Winslow, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **33** (1), 1 (2005). DOI: 10.1081/bio-200046634
8. N. Willis, M. C. Clapham, and W. W. Mapleson, *Br. J. Anaesth.* **59** (9), 1160 (1987). DOI: 10.1093/bja/59.9.1160
9. J.-A. Collins, A. Rudenski, J. Gibson, et al., *Breathe* **11** (3), 194 (2015). DOI: 10.1183/20734735.001415
10. M. A. Danish, *Cureus* **13** (2), e13240 (2021). DOI: 10.7759/cureus.13240
11. J. Melius, *Am. J. Crit. Care* **3** (5), 353 (1994).
12. J.-L. Teboul, O. Hamzaoui, and X. Monnet, *Crit. Care* **15** (6), 1005 (2011). DOI: 10.1186/cc10491
13. A. V. Hill, *J. Physiol.* **40**, i (1910).
14. G. S. Adair, A. V. Bock, and H. Field Jr., *J. Biol. Chem.* **63**, 529 (1925).
15. S. R. Bernard, *Bull. Math. Biophys.* **22**, 391 (1960). DOI: 10.1007/BF02476722
16. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, В. Ю. Сулин и др., *Биофизика* **66** (6) 1065 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106003X
17. H. Bateman and A. Erdelyi, *Higher Transcendental Functions* (McGraw-Hill, New York, 1953), Vol. 2.
18. J. P. Boyd, *Chebyshev and Fourier spectral methods* (Dover Publications, New York, 2001).
19. E. Meijering, *Proc. IEEE* **90** (3), 319 (2002). DOI: 10.1109/5.993400
20. S. A. Frank, *Biol. Direct* **8** (1), 1 (2013). DOI: 10.1186/1745-6150-8-31
21. M. L. Coval, *J. Biol. Chem.* **245** (23), 6335 (1970). DOI: 10.1016/S0021-9258(18)62614-6

22. J.-H. S. Hofmeyr and H. Cornish-Bowden, *Bioinformatics* **13** (4), 377 (1997). DOI: 10.1093/bioinformatics/13.4.377
23. S. Goutelle, M. Maurin, F. Rougier, et al., *Fund. Clin. Pharmacol.* **22** (6), 633 (2008). DOI: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x
24. J. N. Weiss, *FASEB J.* **11** (11), 835 (1997).
25. R. M. Winslow, M. Swenberg, R. L. Berger, et al., *J. Biol Chem* **252**, 2331 (1977). DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40559-X
26. F. M. Dekking, C. Kraaikamp, H. P. Lopuhaä, et al., *A Modern Introduction to Probability and Statistics: Understanding Why and How* (Springer-Verlag, London, 2005). DOI: 10.1007/1-84628-168-7
27. G. Hüfner, *Arch. Physiol.* **31**, 28 (1890).
28. J. T. Edsall, *J. Hist. Biol.* **5** (2), 205 (1972). DOI: 10.1007/BF00346659
29. A. H. B. Wu, *Tietz clinical guide to laboratory tests* (Elsevier Science, St. Louis, MO, 2006).
30. N. Griffon, V. Baudin, W. Dieryck, et al., *Protein Sci* **7** (3), 673 (1998). DOI: 10.1002/pro.5560070316
31. N. Kaihnsa, Y. Ren, M. Safey El Din, et al., *J. Math. Biol.* **81** (4–5), 1169 (2020). DOI: 10.1007/s00285-020-01540-8
32. H. Abeliovich, *Biophys. J.* **89** (1), 76 (2005). DOI: 10.1529/biophysj.105.060194
33. O. Rapp and O. Yifrach, *PLoS One* **12** (8), e0182871 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0182871
34. H. Dahl, S. Taudorf, D. M. Bailey, et al., *Exp. Physiol.* **105** (7), 1063 (2020). DOI: 10.1113/EP088615
35. C. F. S. Bonafe, D. F. L. Neto, E. A. Martínez, et al., *Chem. Papers* **74** (9), 2861 (2020). DOI: 10.1007/s11696-020-01125-1
36. S. Srinivasan, F. H. Wagh, S. Idicula-Thomas, et al., *Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes* **1862** (4), 183242 (2020). DOI: 10.1016/j.bbamem.2020.183242
37. A. Horovitz and T. Mondal, *J. Phys. Chem. B* **125** (1), 70 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcc.0c09351
38. M. Żebrowska, M. Weippert, and M. Petelczyc, *Front. Physiol.* **12** (945), (2021). DOI: 10.3389/fphys.2021.695569
39. L. Acerenza and E. Mizraji, *Biochim. Biophys. Acta* **1339** (1), 155 (1997). DOI: 10.1016/s0167-4838(96)00228-2
40. A. Horovitz, *Proc. Roy. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* **229** (1256), 315 (1986). DOI: 10.1098/rspb.1986.0088
41. T. R. Chay and C. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** (12), 3914 (1973). DOI: 10.1073/pnas.70.12.3914
42. I. M. Klotz, *J. Biol. Chem.* **279** (1), 1 (2004). DOI: 10.1074/jbc.X300006200
43. H. A. Saroff, *Biochemistry* **30** (42), 10085 (1991). DOI: 10.1021/bi00106a004
44. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т комп. исслед. (ИКИ), М. — Ижевск, 2015).
45. D. Leipply and D. E. Draper, *Biochemistry* **49** (9), 1843 (2010). DOI: 10.1021/bi902036j
46. A. F. Kolodziej, T. Tan, and D. E. Koshland, Jr., *Biochemistry* **35** (47), 14782 (1996). DOI: 10.1021/bi961481v
47. A. Whitty, *Nat. Chem. Biol.* **4** (8), 435 (2008). DOI: 10.1038/nchembio0808-435

New Interpretation of the Hill Coefficient

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

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

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

A modification of Hill's equation describing the process of cooperative binding of a ligand by a macromolecule is proposed. The parameter “relative coefficient of cooperativity” introduced by us into this equation allows us to ensure the conjugation of the Hill coefficient with the number of interacting subunits in the oligomer. This makes it possible to clarify the physical meaning of this coefficient and explains the nature of its non-integer values. Normalization of the relative coefficient of cooperativity gives an additional opportunity to compare such coefficients for oligomers with different numbers of protomers. The proposed relative coefficient of cooperativity can be useful in solving a wide range of problems related to the description of the coordinated interaction of elements at all levels of the spatial organization of proteins, nucleic acids, their complexes, as well as such interaction for receptors and their mediators.

Keywords: cooperative binding of ligands, adsorption isotherm, dissociation curve of oxyhemoglobin, Hill's equation, Hill's coefficient, relative coefficient of cooperativity