1) **Uveďte hmotnostní a látkovou koncentraci hemoglobinu v krvi vztaženou na monomer Hb.**
c=2,15-2,65mmol/l. Hmotnostná koncetrácia Muž: 130-180g/l Žena: 120-160g/l

2) **Vypočtěte, jaký objem kyslíku se může maximálně navázat na 1 g hemoglobinu.**
Objem kyslíka ktorý možno maximálne naviazat: V=1,4ml.
Výpočet: 1 mol Hb naviaže 4 mol kyslíka.
1 mol Hb ….. 4moly O_2
m = 1g
M_r = 64000
n = m/M = 1/64000 = 0,000015625mol Hb --------*4 = 0,0000625 mol O_2
$M(O_2)$ = 32 ……. $m(O_2)$ = n*M = 0,0000625*32 = 0,002g
$n = V/V_m$ ….. $V = n * V_m$ = 0,0014l

3) **Při reakci izolovaného hemu s kyslíkem ve vodném roztoku dochází k oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+}. Jak reaguje s kyslíkem hemoglobin? Vysvětlete, čím je způsoben rozdíl.**
V terciarnej štruktúre hemoglobinu sú jednotlivé helikálne úseky stočené tak, aby zvyšky hydrofóbnych aminokyselín smerovali dovnútra "gule" a zvyšky hydrofilných aminokyselín smerovali von z "gule". Tým vzniká vo vnútri hemoglobinu hydrofóbna kapsa, v ktorej je umiestnený hem a je tak chránený pred oxidáciou, ktorá by bola nežiaduca - vznikol by hemiglobin.

4) **Charakterizujte sekundární a terciární strukturu globinového řetězce.**
Sekundární struktura globinového řetězce – polypeptidové řetězce sbaleny do 8 α-helixů (= pravotočivá spirálovitá konformace).
Terciární struktura – určena polaritou aminokyselin – hydrofobní aminokyseliny se stahují dovnitř molekuly a vytváří tzv. hydrofobní kapsu globinu (do ní je uzavřen hem s atomem Fe); hydrofilní části jsou na povrchu proteinu.

5) **Charakterizujte strukturu hemu a jeho vazbu na globin.**
Je tvorený tetrapyrolovým jadrom, v strede sa nachádza železnatý kationt (Fe^{2+}), ktorý je naviazaný koordinačne-kovalentnými vazbami. Na tieto jadrá sú viazané dalšie substituenty. Hém patrí medzi porfyríny. V hemu sú 4 vazby železa obsadené a 2 neobsadené – jedna spája železo s globínom a jedna je určená pre väzbu s kyslíkom.
Konfigurácia Fe^{2+}: $1s^2\ 2s^2\ 2p^6\ 3s^2\ 3p^6\ 4s^2\ 3p^6$

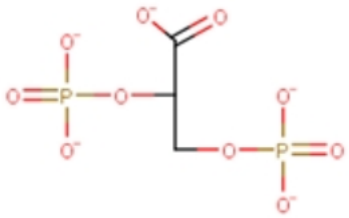
6) **K jaké změně ve struktuře hemu dochází po navázání O_2?**
Mění se konformace z deoxyhemoglobinu na oxyhemoglobin. Fe^{2+} může reverzibilně vázat a přenášet molekulu kyslíku. Oxygenace = změna elektronového stavu hemu. Oxidací molekuly hemoglobinu vzniká oxyhemoglobin, čímž se mění elektronový stav kompexu Fe^{2+}. Oproti deoxyhemoglobinu má další vazbu přes dva atomy na AMK → oxygenace mění terciární a kvartérní strukturu globinu, způsobuje zánik nevazebných interakcí. To se projeví změnou barvy z tmavě červeného odstínu (žilní krev) na odstín jasně červený (tepenná krev).

7) **Jak se přitom mění konformace proteinových podjednotek?**
Kvarterní struktura hemoglobinu určuje prostorové uspořádání jednotlivých podjednotek tetrameru hemoglobinu a interakci mezi nimi (hydrofobní nebo iontové interakce). T-konformace (tension, napjatý stav) hemoglobinu je charakteristická pro tetramer deoxyhemoglobinu. Postupnou oxygenací jednotlivých podjednotek hemoglobinu dochází k zániku nevazebných interakcí, čímž se usnadňuje navázání kyslíku na ještě neoxygenované podjednotky. U úplně nasyceného hemoglobinu se tudíž mluví o R- konformaci (relaxed, relaxovaný stav).

8) **Popište hlavní typy nevazebných interakcí, které se uplatňují mezi podjednotkami Hb v oxygenované a deoxygenované formě.**
Vodíkové vazby, iontové vazby: mezi dvěma páry peptidových řetězců.
Hydrofobní vazby: hydrofilní aminokyseliny peptidových řetězců vytváří vazby s molekulami vody a výsledkem je, že hydrofobní aminokyseliny se stahují dovnitř struktury hemoglobinu a vzniká hydrofobní kapsa.

9) Napište vzorec 2,3-bisfosfoglycerátu a naznačte jeho vazbu v T-formě hemoglobinu.

2,3-bifosfoglycerát vzniká jako produkt glykolýzy, váže se na deoxyhemoglobin a stabilizuje T-formu deoxyhemoglobinu.



Váže se svými čtyřmi zápornými skupinami fosfátů na β podjednotky hemoglobinu iontovými vazbami.

10) Jaká je molekulární podstata tzv. Bohrova efektu?

- popisuje závislost afinity kyslíku k hemoglobinu na hodnotě pH a koncentraci CO_2
- jsou děje, které vyplývají ze skutečnosti, že oxyhemoglobin je silnější kyselina než deoxyhemoglobin

1. Ve tkáních – oxid uhličitý reaguje s vodou na kyselinu uhličitou.

   $2H_2O + 2CO_2 \rightarrow 2H_2CO_3$ (ENZYM KARBONÁTDEHYDRATÁZA)

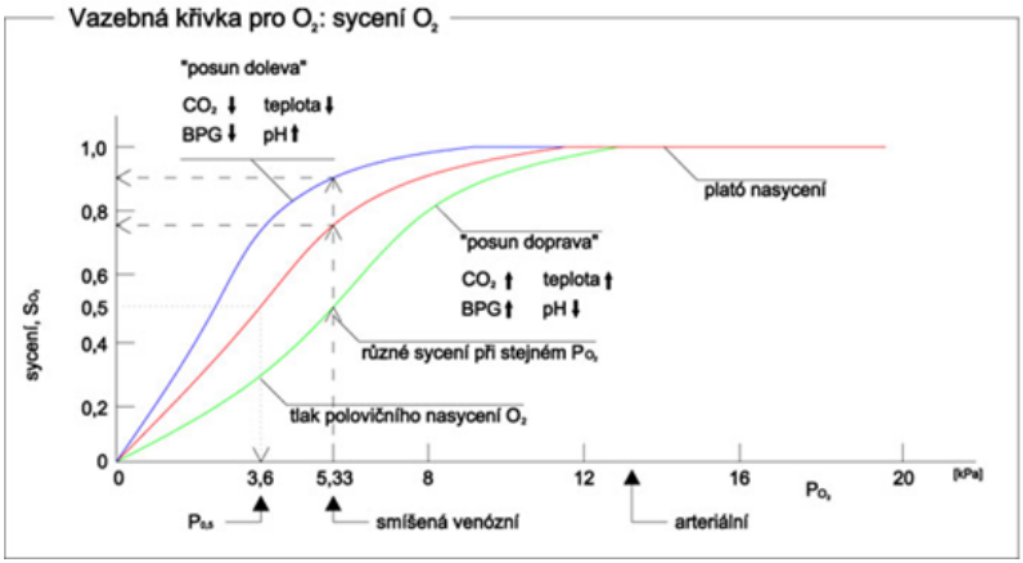
   → způsobuje disociaci kyseliny uhličité

   $2H_2CO_3 \rightarrow 2H^+ + 2HCO_3^-$

   → vznikající H^+ snižuje pH ve tkáních
2. Oxygenovaný Hb z plic putuje do tkání, kde je nucen odevzdat kyslík (je zásaditější a proto lépe váže H^+).
3. V plicích probíhá děj obráceně: deoxy Hb ztrácí H; ten reaguje s HCO_3^- a vzniká H_2O a CO_2

11) Jaká je molekulární podstata snížení afinity hB ke kyslíku v přítomnosti 2,3-BPG?

Čím vyšší koncentrace 2,3–bisfosfoglycerátu (BPG), tím nižší afinita hemoglobinu ke kyslíku. Posun saturační křivky doprava. Čím nižší koncentrace 2,3–BPG, tím vyšší afinita hemoglobinu ke kyslíku. Posun saturační křivky doleva.



12) Která z forem hemoglobinu (Hb nebo HbO2) je silnější kyselinou, tj. snadněji disociuje?

Silnější kyselinou je HbO_2 (oxyhemoglobin), má nižší pKA = 6,2 a lépe disociuje.

$HHbO_2$ -------> $HbO_2^- + H^+$

Slabší kyselinou je Hb (deoxyhemoglobin), má vyšší pKA = 7,8 a hůře disociuje.

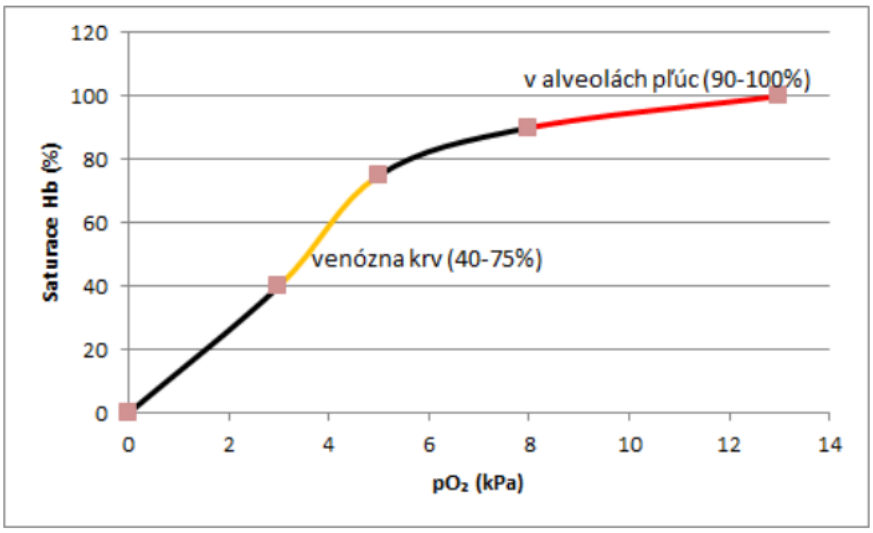
HHb -------> $Hb^- + H^+$

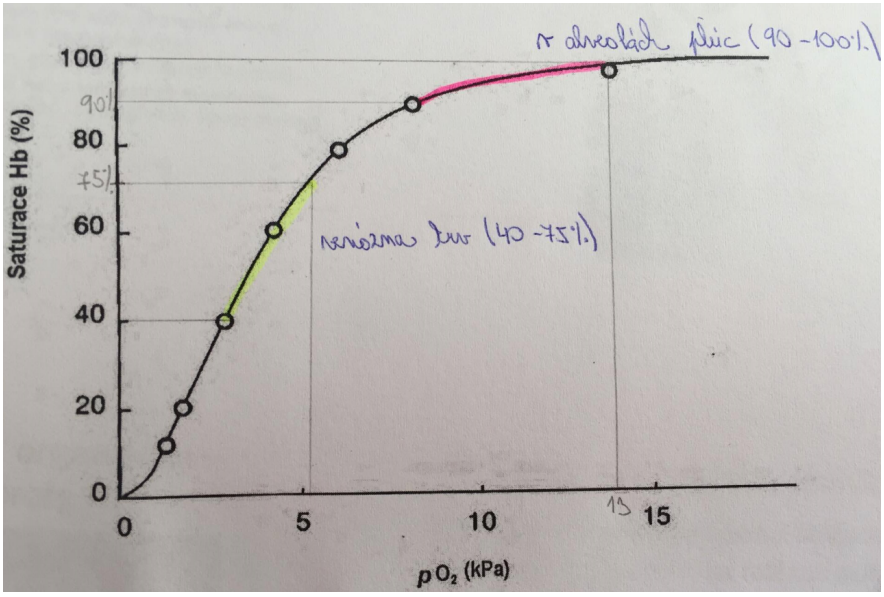
13) Která z aminokyselin je zodpovědná za acidobazické vlastnosti Hb při fyziologickém pH?

Histidin – hodnota pKa je nejblíže fyziologickému pH.

Imidazolová struktura histidinu je jen slabě bazická, a proto může vystupovat jako donor i akceptor H^+ (chová se jako kyselina i jako báze).

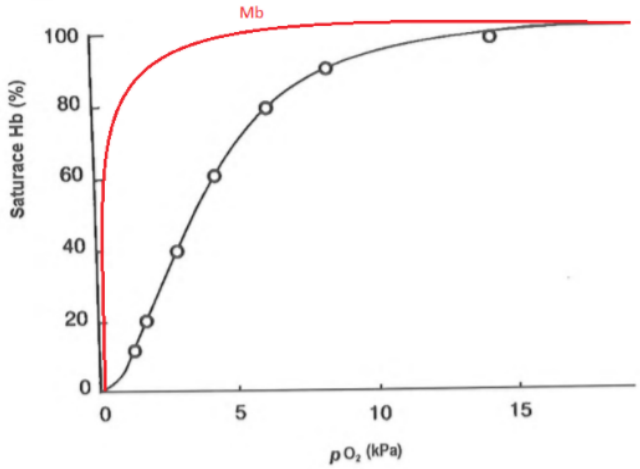
14) Do grafu naznačte oblast pO_2, jaký je v alveolách plic a ve smímšené venózní krvi. Z kolika procent je hemoglobin při těchto tlacích přibližně saturován?





15) Do grafu doplňte saturační křivku pro myoglobin. Vysvětlete rozdíly v charakteru obou křivek. Který z obou proteinů váže kyslík pevněji?

Tetramerní struktura hemoglobinu na sebe dokáže přenášet molekuly kyslíku s mnohem větší účinností než pomocí jednotlivých řetězců v případě myoglobinu.



Myoglobin váže molekulu kyslíku silněji než hemoglobin.

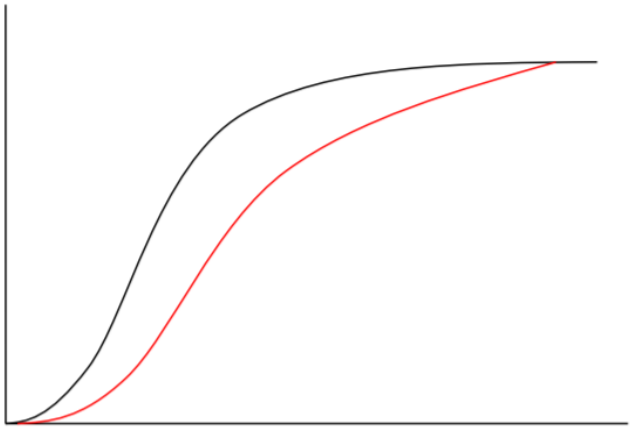
16) Vazba kyslíku na hemoglobin má kooperativní charakter. Vysvětlete.

Hb váže O_2 slabě při nižších pO_2 a silněji při vyšších pO_2. Po navázaní první molekuly kyslíku na hemoglobin se mnohonásobně zvýší afinita dalších molekul kyslíku.

17) Na saturační křivce hemoglobinu vyznačte změny, které vyvolá:

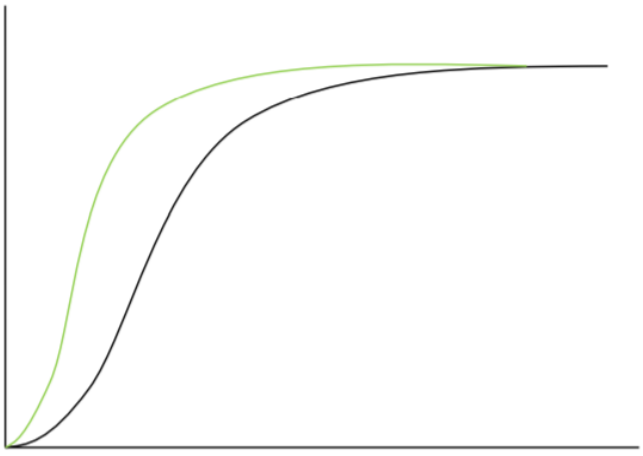
a) snížení pH

- Posun doprava (Bohrov efekt).

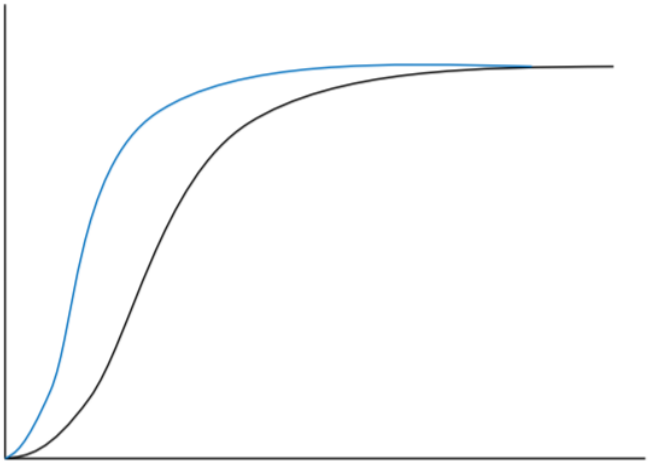


b) snížení pCO_2

- Vedie k zvýšeniu pH. To vede k zvýšeniu afinity hemoglobinu ku kyslíku. Posun doľava.



c) snížení koncentrace 2,3-BPG
-Vyššia afinita hemoglobinu ku kyslíku. Posun saturační krivky doľava.



18) Zvýšení teploty ovlivní průběh saturační křivky podobným způsobem jako 2,3-BPG. Jak se tato skutečnost v praxi projevuje?

- zvýšení teploty posunuje saturační křivku doprava – tj. snížení afinity k O_2
- snížení teploty působí opačně
- kritická je teplota těla pod 20 °C, kdy Hb ztrácí schopnost uvolnit O_2 a tkáně trpí nedostatkem
- dochází k poruchám srdečního rytmu až zástavě
- snižuje se tělesná teplota

19) Srovnejte rozdíl v afinitě HbA a HbF ke kyslíku. Čím je tento rozdíl způsoben a jaký je jeho význam?

HbF je důležitý v dětství. Vyšší koncentrace u dospělých je patologická. HbF (plod) má vyšší afinitu ke kyslíku než HbA (matka), tím pádem je možný přenos kyslíku z krve matky do krve plodu. Způsobeno je to tím, že u gama podjednotek je potřeba dodat menší energii ke zrušení vazebných interakcí než u beta podjednotek hemoglobinu u člověka.

20) Pojmenujte deriváty hemoglobinu vzniknuvší:

a) vazbou O_2, CO, CO_2

- Oxyhemoglobin – O_2
- Karbonylhemoglobin - CO
- Karbaminohemoglobin – CO_2

b) oxidací

- oxidace hemoglobinu na methemoglobin:

$$HbFe^{II} + [Fe^{III}(CN)_6]^{3-} \rightarrow HbFe^{III} + [Fe^{II}(CN)_6]^{4-}$$

21) Jaké jsou nejčastější příčiny otravy CO, jak lze otravu prokázat, jaká je první pomoc?

Otrava oxidem uhelnatým nastane při přesycení organizmu oxidem uhelnatým. CO vzniká při hoření za nedostatku kyslíku, např. při požáru, u sporáků, u přenosných ohřívačů, nesprávně odvzdušněné ohřívače vody atp.. Nebezpečný je proto, že je bezbarvý a nedráždivý, člověk si jeho přítomnost neuvědomí a afinita k hemoglobinu je 240x vyšší než afinita kyslíku. V mnoha případech se na otravu CO ani nepomýšlí. Jednou z možností stanovení diagnózy je určení hladiny karbonylhemoglobinu. Obvykle se provádí analýzou krevního vzorku spektrofotometricky (co-oxymetrem) nebo stejnou metodou, z čidla speciálního přístroje (neinvazivně, obdoba pulsní oxymetrie). První pomoc: Vždy zajistit odsun pacienta na čerstvý vzduch a lékařské ošetření, v případě potřeby KPCR.

22) Vysvětlete pojem methemoglobinemie a její možné příčiny (vrozená, toxická).

Methemoglobinemie = onemocnění způsobené zvýšením hladiny methemoglobinu v krvi.
Rozlišujeme dva typy:

a) vrozenou methemoglobinemii

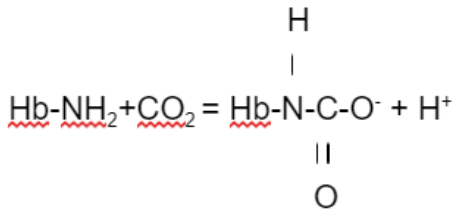
Osoba s vrozenou methemoglobinemií má v krvi zvýšenou hladinu HbM, což znamená, že histidin F8 je v primární struktuře zaměněn za tyrosin. Hydrofobní kapsa kolem hemu je tak narušena a dochází snáze k oxidaci železa.

b) toxickou methemoglobinemii

Osoby s toxickou methemoglobinemií byly vystaveny působení anilinu, nitrobenzenu, alkynitrátů, dusitanů, chlorečnanů a dalších látek, které způsobí oxidaci železa.

23) Část CO_2 uvolňovaného ve tkáních se váže na hemoglobin ve formě karbamátu. Napište rovnici jeho vzniku.

CO_2 se napojuje na NH_2 skupiny deoxyhemoglobinu.



24) Které faktory ovlivní množství glykovaných proteinů v krvi?

Koncentrace sacharidů a proteinů a jejich kolísání (koncentrace proteinů v krvi relativně konstantní, rychlost glykace je úměrná koncentraci sacharidů), doba expozice, biologický poločas daného proteinu, teplota.

25) Jaké jsou referenční meze HbA_{1c} v krvi?

Hodnoty HbA1c vyjadřujeme v procentech (%) jako procento glykovaného hemoglobinu z celkového hemoglobinu v krvi. Od 1.ledna 2012 se v České republice používají jednotky mmol/mol dle tzv. standardu IFCC. Do 31.12. 2011 se požívaly procenta (také dle IFCC). Přepočet je jednoduchý, mmol/mol je desetinásobek původních hodnot.

U zdravého člověka netrpícího diabetem se hodnoty HbA1c pohybují v rozmezí 28 – 40 mmol/mol (2,8 – 4,0 % dle IFCC).

Podezření na diagnózu cukrovky vzniká při hodnotách 39 - 46 mmol/mol (3,9 - 4,6 %), pro diagnostiku diabetu pak svědčí hodnota nad 47 mmol/mol (4,7 %).

U pacienta s diabetes mellitus (cukrovkou) se rozlišují 3 stupně kompenzace (nevztahuje se na těhotné diabetičky):

Stupeň kompenzace	**Hodnota HbA1c**
Výborná	do 43 mmol/mol (do 4,3 % dle IFCC)
Uspokojivá	43 - 53 mmol/mol (4,3 - 5,3 %)
Neuspokojivá	nad 53 mmol/mol (nad 5,3 %)

26) Jaká je molekulární podstata srpkovité anémie?

V krevním řečišti může docházet ke vzniku patologických hemoglobinů mutací v jednotlivých řetězcích Hb. Např. HbS, záměna Glu-6-Val (v β-řetězci je glutamová kyselina nahrazena valinem).

27) Co je příčinou srpkovitého tvaru erytrocytů?

Základem změny je nová vlastnost HbS. Dochází k vytvoření nepolární oblasti a místo tetrameru vznikají řetízkové aglomeráty způsobující nevhodný tvar erytrocytů.