**Тема 5.4 Обмен аммиака. Пути образования, транспорта и обезвреживания аммиака**

***Цель занятия***

-изучить пути образования и пути обезвреживания аммиака;

-знать механизмы синтеза глутамина, мочевины, аммониогенез;

-знать органную локализацию образования конечных продуктов азотистого обмена, возможные причины нарушений этих процессов при патологии;

-уметь определять содержание мочевины в сыворотке крови и моче;

-уметь определять свободный аминный азот (азот свободных аминокислот, содержащихся в сыворотке крови).

**Вопросы для самоподготовки**

1. Источники и основные пути образования аммиака в организме (схема)
2. Токсичность NH3 и причины его токсичности.
3. Транспорт аммиака от тканей к печени и почкам:

а) в виде амидов (глютамина и аспарагина)

б) в виде аланина (глюкозо- аланиновый цикл)

3. Основные пути обезвреживания аммиака (схема)

а) восстановительное аминирование альфа- кетоглутарата

б) процесс амидирования глутамата и аспартата (образование глютамина и аспарагина)

в) образование солей аммония (аммониогенез в почках)

г) биосинтез мочевины – орнитиновый цикл в печени. Химизм, биологическая роль.

4. Нарушения образования мочевины. Гипераммониемия.

**Практическая часть занятия**

**Лабораторная работа 1**

***Определение содержания мочевины в сыворотке крови и моче***

*Принцип метода*: мочевина образует с диацетилмоноксимом в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа в кислой среде комплекс, имеющий красное окрашивание. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию мочевины.

*Ход работы:* в пробирку вносят пипеткой 0,01 мл мочи, разведенной в 50 раз, или 0,01 мл сыворотки крови, добавляют 2 мл рабочего раствора и содержимое перемешивают. Пробирку закрывают крышкой из алюминиевой фольги и инкубируют раствор в кипящей водяной бане 10 мин. Затем охлаждают пробирки под струей проточной воды до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность против контроля, обработанного аналогичным образом и содержащего 2 мл рабочего раствора. Измерения проводят в 1 см. кювете при λ = 525 нм. Одновременно обрабатывают эталон, содержащий 0,01 мл эталонного раствора мочевины и 2 мл рабочего раствора.

Схема определения мочевины

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | Проба | Эталон | Контроль |
| Сыворотка, (мл.) | 0,01 | - | - |
| Разведенная моча, (мл.) | 0,01 | - | - |
| Рабочий раствор, (мл.) | 2 | 2 | 2 |
| Эталонный раствор, (мл) | - | 0,01 | - |
| Вода дистил., (мл.) | - | - | 0,01 |

*Расчет :* Мочевина сыворотки (ммоль/л)= ∙ 16,65



Мочевина мочи (ммоль/л)= ∙ 16, 65∙50



Е В норме содержание мочевины в сыворотке крови: дети 1,8- 6,4 ммоль/ л

взрослые 2,5- 8,3 ммоль/л

в моче: 330-580 ммоль/л

*Вывод:*

Меры предосторожности при работе с набором

В рабочем растворе содержится ядовитый тиосемикарбазид. При работе с ним необходимо соблюдать действующие правила обращения с ядовитыми веществами в химической лаборатории.

**Лабораторная работа 2**

***Экспресс метод определения мочевины в сыворотке крови с применением индикаторной бумаги «Уреатест» или «Урана».***

*Принцип метода: м*очевина под действием фермента уреазы (класс гидролаз, оптимум рН 7-7,2) разлагается с образованием аммиака, который окрашивает желтую полоску реактивной хроматографической бумаги в голубовато-зеленый цвет. Высота окрашенной зоны в мм прямопропорциональна концентрации мочевины.

*Ход работы: к*онец хроматографической полоски, пропитанной ферментом, погружают в исследуемую сыворотку крови (не смачивая красной полоски- зоны раздела). Бумажку быстро помещают в чистую сухую пробирку, закрывают пробкой и оставляют на 30 мин. при температуре 370 С в термостате. Затем измеряют высоту индикаторной зоны, окрашенной в голубовато-зеленый цвет в мм., сравнивают ее со шкалой.

|  |  |
| --- | --- |
| Высота окрашенной зоны | Содержание мочевины |
| До 1 мм | Нормальное |
| 2-3 мм | Слегка повышенное |
| 3-5 мм | Повышенное |
| Выше 5 мм | Сильно повышенное |

*Результат.*

*Вывод*

Практическая значимость работы. Повышение уровня мочевины в крови наблюдается при заболеваниях почек (нарушение выделительной функции), при усиленном катаболизме белков, при диете с высоким содержанием белка, при обезвоживании организма (рвота, понос). Снижение отмечается при недостатке белка в питании, при тяжелых заболеваниях печени (желтуха, гепатиты, цирроз печени).

**Лабораторная работа 3**

***Определение свободного аминного азота (азот свободных аминокислот, содержащихся в сыворотке крови)***

*Принцип метода: с*одержание азота определяется колориметрически по интенсивности окрашивания с нингидриновым реактивом.

Ход работы. в пробирку помещают 0,5 мл. сыворотки крови и 0,5 мл. 0,04 N раствора уксусной кислоты. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 5 минут, затем охлаждают, добавляют 1 мл. дистиллированной воды и содержимое фильтруют через бумажный фильтр.

К 0,5 мл фильтрата добавляют 0,5 мл. 1% раствора нингидрина. Пробирку помещают на 20 минут в кипящую водяную баню, затем охлаждают, объем доводят дистиллированной водой до 10 мл. Определяют оптическую плотность пробы на ФЭКе в кювете 5 мм при зеленом светофильтре. Расчеты проводят по калибровочному графику.

В норме количество аминного азота составляет 2,9 мг%

*Результат:*

*Вывод:*

**Практическая значимость работы**. Увеличение содержания аминокислот в крови наблюдается при гепатите, атрофии печени, при отравлениях фосфором, четыреххлористым углеродом, хлороформом, при квашиоркоре.

Уменьшение уровня аминокислот наблюдается при нефрозах, после введения инсулина, гормона роста, андрогенов.

**Вопросы для самоконтроля**

1. **Ответить на следующие вопросы:**

а) Какими путями и где в организме образуется аммиак? Что представляет из себя транспортная форма аммиака?

б) Каково происхождение атомов в молекуле мочевины?

1. **Написать уравнения реакций синтеза мочевины**, связанных с затратой АТФ. Указать, какое количество АТФ расходуется при синтезе одной молекулы мочевины.
2. **Назвать механизмы детоксикации аммиака.**
3. **Решите следующие ситуационные задачи.**

* При тяжелых вирусных гепатитах у больных может развиться печеночная кома, обусловленная в частности, токсическим действием аммиака на клетки мозга. Какова причина столь значительного накопления аммиака в крови? Как изменяется концентрация мочевины в крови у данных больных?
* Аммиак является раздражителем нервной системы. При введение глутаминовой кислоты больным эпилепсией их состояние улучшается, частота приступов уменьшается. Почему?
* В эксперименте на животных установлено, что в печени снижена активность фермента аргиназы. К чему это приведет?

***Основная учебная литература***

1. Чиркин, А.А. Биохимия: Учебное руководство/ А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. - М.: Мед. лит., 2010.-624 с.

***Дополнительная литература***

1. Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник / под ред. С. Е. Северина. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. — 624 с.
2. Нельсон, Д. Основы биохимии Ленинджера. В трех томах. / Д.Нельсон, М Кокс. -М.: Бином. Лабораторные знания, 2011.- т.1 -682 с.
3. Уайт, А. Основы биохимии. В трех томах / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит. – М.: Мир, 1981.- 1877с