

Практичне заняття № 3

Тема: Біологічно-активні сполуки – гормони та ферменти. Кількісне визначення активності амілази.

Мета: Опанувати метод визначення активності амілази. Аналізувати зміну активності ферменту амілази в біологічних рідинах

Питання для обговорення:

1. Нейроімуноендокринна регуляція
2. Класифікація гормонів
3. Вплив гормонів на дитячий організм
4. Будова та властивості ферментів
5. Механізм дії ферментів
6. Фактори, що впливають на активність ферментів
7. Зміни ферментного складу в онтогенезі

Завдання 1. Принцип визначення активності амілази за Вольгемутом:

Метод Вольгемута ґрунтується на здатності амілази розщеплювати (гідролізувати) крохмаль. В ході роботи виявляють мінімальну кількість ферменту, здатного повністю розщеплювати 1 мл 0,1 %-го розчину крохмалю. Цю кількість ферменту приймають за одиницю амілазної активності.

Амілазна активність виражається в кількості 0,1%-го розчину крохмалю в мілілітрах, яку може розщепити (гідролізувати) 1 мл слини при температурі 37°C протягом 30 хв. В нормі амілазна активність слини – $A = 160 - 320$ одиниць.

Хід роботи. У сім пронумерованих пробірок вносять з бюретки по 1 мл води. У першу пробірку додають 1 мл розведеної в 10 разів слини. Вміст добре перемішують і 1 мл отриманого розчину переносять з першої пробірки до другої, з неї – в третю, таким чином у кожній наступній пробірці вміст ферменту в два рази менше, ніж у попередній. Потім в усі пробірки додають по 2 мл 0,1%-го розчину крохмалю, перемішують та ставлять пробірки у водяну баню (чи термостат) при 37°C на 30 хв.

Після інкубації пробірки виймають та охолоджують для зупинки дії ферменту. В кожную пробірку додають по 2 краплі розчину йоду (0,1%-ний розчин йоду в 0,2%-ному розчині йодиду калію), перемішують та спостерігають за зміною забарвлення. Рідина у пробірках може забарвлюватися у жовтий, червоний та синій колір. Жовтий колір свідчить про повне розщеплення крохмалю. Результати спостережень вносять в таблицю, позначаючи синє, червоне та жовте забарвлення літерами “С”, “Ч”, “Ж”. Відмічають останню пробірку з розчином жовтого кольору та проводять розрахунок амілазної активності слини:

Показник	№ пробірки						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Розведення слини	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Кількість 0,1%-го розчину крохмалю	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл	2 мл
Забарвлення після додавання йоду							

Остання пробірка з розчином жовтого кольору							
---	--	--	--	--	--	--	--

Розрахунок. Для розрахунку активності амілази необхідно знати розведення слини в останній пробірці, де відбувся повний гідроліз крохмалю.

Наприклад, остання пробірка з розчином жовтого кольору виявляється четвертою, в якій слина розведена у 160 разів.

Складають пропорцію та розраховують активність амілази:

1/160 мл слини розщеплює 2 мл 0,1 %-го розчину крохмалю;

1мл слини розщеплює - X мл 0,1 %-го розчину крохмалю,

Звідки:

$$X = \frac{2 \times 1 \times 160}{1} = 320 \text{ мл } 0,1\% \text{ розчину крохмалю.}$$

А отже: А (амілазна активність) = 320 одиниць.

Зробити висновки з проведених досліджень опираючись на результати відео за посиланням: https://www.youtube.com/watch?v=leu5a_00QN8.

Завдання 2.

Локалізацію фермента в тканині чи клітині ідентифікують *in situ* (місці знаходження, у природному середовищі) гістохімічними методами. Розподіл ферментів у субклітинних органелах вивчають після попереднього фракціонування клітинних гомогенатів шляхом високошвидкісного центрифугування, визначаючи вміст ферментів у кожній фракції.

Для цього спочатку руйнують клітинну структуру за допомогою відповідного дезінтегратора, утворена гомогенізована маса підлягає диференційному центрифугуванню при температурі 0-40° С. Центрифугування різними швидкостями гомогенатів різних тканин забезпечує осідання субклітинних структур, що дозволяє згодом дослідити їх склад. Якщо говорити про вузькоспеціалізовані клітини, то ферментів, які забезпечують їх функціонування в цих клітинах знаходиться більше порівняно з іншими. Наприклад, у клітинах міокарда підвищена кількість креатинкінази та аспартатамінотрансферази, у гепатоцитах – аланінамінотрансферази, в остеобластах – лужної фосфатази тощо.

Заповнити таблицю «Локалізація деяких ферментів у клітині»

Місцезнаходження у клітині	Назва ферментів	Значення/функція ферментів
Цитоплазма		
Мітохондрії		
Лізосоми		
Плазматична мембрана		
Ядро		

Завдання для самостійного виконання:

Заповнити таблицю «Класифікація гормонів та їх біологічні ефекти» за прикладом гормону інсуліну:

Групи гормонів	Представники гормонів	Ендокринні залози, що виробляють гормон	Біологічні ефекти гормону
Стероїдні	Кортикостерон Гідрокортизон Кортизон Альдостерон	Кора наднирників	
	Андростендіон Тестостерон	Сім'яники	
	Естрадіол Прогестерон	Яєчники	
Похідні амінокислот	Тіроксин Трийодтіронін	Щитоподібна залоза	
	Адреналін Норадреналін	Мозковий шар наднирників	
Пептидні гормони	Окситоцин Вазопресин	Гіпофіз	
	Глюкагон	Підшлункова залоза	
	Тіреокальцитонін	Щитоподібна залоза	
Білкові гормони	Інсулін	Підшлункова залоза	Збільшує проникність стінок м'язових та жирових клітин для глюкози та не впливає на проникність стінок нервових клітин – нейронів. Сприяє транспорту глюкози у клітини і, отже, забезпечує засвоєння глюкози організмом, синтез глікогену та накопичення його у м'язових волокнах.
	Соматотропний гормон (соматотропін, гормон росту)	Гіпофіз	

Зробити висновок про роль гормонів та ферментів в організмі людини.