UNIVERSITÀ DI PISA

BIOCHIMICA APPLICATA MEDICA

GINO GIANNACCINI

Academic year	2020/21
Course	FARMACIA
Code	452EE
Credits	9

Modules	Area	Type	Hours	Teacher(s)
BIOCHIMICA APPLICATA MEDICA	BIO/10	LEZIONI	79	LAURA BETTI CHIARA GIACOMELLI GINO GIANNACCINI

Obiettivi di apprendimento

Conoscenze
Alla fine del corso, lo studente sarà in grado di:

- comprendere gli strumenti e alle metodologie utilizzate per lo studio di materiali biologici
- conoscere il razionale alla base delle principali tecniche di analisi di biochimica clinica,
- applicare le principali metodiche biochimiche alle analisi cliniche
- comprendere i risultati ottenuti dalla corretta lettura dei referti di semplici analisi biochimico-cliniche.

Modalità di verifica delle conoscenze
Il docente verificherà l'apprendimento degli obiettivi intermedi durante lo svolgimento del Corso, attraverso un dialogo diretto con gli studenti sugli argomenti trattati a lezione, e eventualmente attraverso prove in itinere.

Capacità

- lo studente saprà riconoscere i principali strumenti e metodi di analisi utili allo studio di campioni biologici
- lo studente sarà in grado di illustrare il funzionamento di tali strumenti
- lo studente sara in grado di riconoscere i risultati prodotti dai suddetti metodi di analisi in un ottica diagnostica/prognostica
- lo studente sarà capace di svolgere test semplici basati su kits su supporto solido

Modalità di verifica delle capacità
Durante le lezioni sarà valutata la capacità degli studenti di acquisire criticamente le nozioni esposte dal docente tramite discussioni e approfondimenti legati alle esercitazioni pratiche.

Comportamenti
Ogni studente è responsabile del rispetto dei più alti standard di integrità accademica. Lo studente dovrà partecipare alle lezioni frontali in modo attivo. Lo studente dovrà sviluppare un approccio appropriato alle norme di un laboratorio di analisi biochimico.

Modalità di verifica dei comportamenti
Durante le lezioni sarà valutata la capacita' degli studenti di acquisire criticamente le nozioni esposte dal docente. Inoltre durante le sessioni di laboratorio saranno valutati il grado di precisione nonchè la capacità operativa e il rispetto delle norme di comportamento.

Prerequisiti (conoscenze iniziali)
Conoscenze di base di Biologia cellulare, Biochimica e Biologia Molecolare. In particolare lo studente dovrà avere conoscenze generali sulla fisiopatologia dei principali organi, sulla funzione delle macromolecole proteiche e sul metabolismo glucidico e lipidico.

Indicazioni metodologiche
Lezioni teoriche affiancate da esercitazioni pratiche di laboratorio
La frequenza è obbligatoria (70% di frequenza, 30-35% per gli studenti genitori/lavoratori)
Si consiglia allo studente di elaborare e apprendere gradualmente i concetti esposti a lezione durante l'arco del semestre anche attraverso la

consultazione di uno dei libri di testo consigliati.

Programma (contenuti dell'insegnamento)

Metodi di coltura delle cellule e analisi citofluorimetrica
Metodi di rottura delle cellule:
Omogenizzazione, French Press, sonicazione, metodi meccanici, metodi enzimatici e con l'uso di abrasivi. Importanza e contenuti dei principali tamponi di estrazione.
Tecniche di centrifugazione:
Principi di base della sedimentazione, tipi di rotori (angolo fisso, alloggiamento versticale, bracci oscillanti, elutriatori). Tipi di centruifughe. Tecniche di sedimentazione (differenziale, in gradiente di densita', per elutriazione). Materiali per gradienti. Ultracentrifughe: generalita' di utilizzo.
Purificazione e caratterizzazione delle proteine:
Proprieta' ioniche degli aminoacidi e delle proteine native e in soluzione. Punto isoelettrico. Stabilita' (termica e in presenza di pH variabile). Criteri di solubilita' e loro utilizzo per la purificazione delle proteine (frazionamento con sali, solventi organici, PEG, precipitazione isoelettrica). Utilizzo della metodi di quantificazione delle proteine in soluzione: spettrofotometria ottica e all'ultravioletto per la determinazione della concentrazione di campioni proteici, colorazione di Bradford, Lowry.
Tecniche elettroforetiche e di trasferimento su carta, immunoblotting analysis:
Principi generali dell'elettroforesi su matrici solide. Elettroforesi su Gel di agarosio e poliacrilammide (PAGE). Matrici per elettroforesi e loro utilizzo. Elettroforesi su SDS-PAGE. Tipi di tamponi utilizzati per l'analisi PAGE : continui e discontinui. Isoelettrofocusing (IEF) e gel bidimensionali: criteri generali. Generalita' sull'uso di gel bidimensionali e il loro utilizzo in proteomica e spettrometria di massa (MALDI-TOF). Western blotting. Tipi di membrane utilizzate e criteri di utilizzo. Rivelazione delle proteine tramite colorazione su gel :Comassie brilliant Blue, Silver staining. Rivelazione delle proteine: tramite colorazione su membrana (Ponceau S) o con anticorpi coniugati ad enzimi o fluorocromi (immunodetection)
Tecniche cromatografiche:
Principi generali di cromatografia (Risoluzione, efficienza, capacità), cromatogramma. Cromatografia su colonna (setaccio molecolare, a scambio ionico, affinita', idrofobicita', HPLC, FPLC): generalità d'utilizzo.
Radio-isotopi:
Naturra della radioattivìtà: Tipi di radioattività. Decadimento. Unità di radioattività. Sicurezza. Rivelamento e misura della radioattività: Tubi di Geiger-Muller. Contatori a scintillazione liquida. Uso in biochimica dei radioisotopi. Traccianti.
Tecniche immunologiche:
Anticorpi policlonali e monoclonali, metodi RIA, ELISA, immunodiffusione radiale.
Le analisi Biochimico-Cliniche:
ruolo nella diagnosi, prevenzione e terapia. Campioni utilizzati nell'analisi di laboratorio. Valori normali. Significato di accuratezza e precisione nelle analisi. Variabilità biologica. Preparazione del campione. Metodi di deproteinizzazione.
Proteine
Introduzione al significato della determinazione degli enzimi in biochimica clinica. Classificazione degli enzimi. Determinazione dell'attività (unità) dei principali enzimi plasmatici. Composizione del sangue, ematocrito, velocità di eritrosedimentazione, funzione delle principali proteine plasmatiche. Profilo elettroforetico del siero umano, classsificazione delle globuline, loro funzione e significato del loro dosaggio nelle analisi biochimico cliniche. Immunoglobuline: deficit primitivo e secondario; gammapatie poli e monoclonali. Proteinuria di Bence Jones, crioglobulinemia. Profilo elettroforetico delle iperlipoproteinemie. Emostasi e fattori della coagulazione: fibrinogeno, inibitori della coagulazione, via intrinseca e via estrinseca. Esami di laboratorio per valutare la coagulazione.
Glucidi
Glucosio. Insulina e controllo della glicemia. Classificazione del diabete. Curve da carico e risposta insulinica, prove per la comprensione del significato di iperglicemia. Metodi per la determinazione del glucosio.
Lipidi
Le lipoproteine: classificazione e significato. Determinazione dei lipidi totali, dei trigliceridi e dei fosfolipidi. Colesterolo. Significato metabolico e clinico. Determinazione del colesterolo, del colesterolo esterificato, e del colesterolo HDL. Determinazione acidi grassi non esterificati.
Composti azotati non proteici
Determinazione dell'azoto totale. Determinazione dell'acido urico e significato nelle patologie correlate. Patologie correlate ad alterazione degli amminoacidi. Separazione degli amminoacidi. HPLC degli amminoacidi. Derivatizzazione pre-colonna degli amminoacidi. Creatina e fosfocreatina. Metabolismo energetico e formazione di creatinina. Determinazione creatina e creatinina. Clearance della creatinina.
Omeostasi del calcio e fattori che la influenzano PTH, calcitonina, vitamina D. Cause di ipoaclcemia e ipercalcemia. Metodi di determinazione del calcio plasmatico. Ruolo fisiologica, determinazione e significato clinico del ferro.
Esame delle urine, esame de sedimento urinario, clearance renale, velocità filtrazione glomerulare. Flusso plasmatico renale, determinazione acido p-aminoippurico. Classificazione, significato clinico, determinazione dei markers tumorali

Il corso prevede inoltre 7 esercitazioni di laboratorio:

- Applicazione della spettrometria di assorbimento atomico ottico (ICP) per l'analisi di campioni biologici
- Analisi del contenuti sieri di metaboliti di rilevanza diagnostica tramite tecniche immunologiche e dosaggi enzimatici
- Manipolazione di colture cellulari e applicazione di metodi di centrifugazione
- Preparazione di lisati proteici e valutazione del contenuto proteico totale
- Analisi elettroforetica di macromolecole
- Tecniche immunoenzimatiche
- Applicazione di tecniche cromatografiche per la separazione di analiti biologici

Bibliografia e materiale didattico

Sono consigliati i seguenti testi per consultazione:
Wilson K, Goulding K. METODOLOGIE BIOCHIMICHE Raffaello Cortina Editore.

Modalità d'esame

L'apprendimento sarà valutato tramite prove in itinere (orali o scritte). L'esame negli appelli ufficiale prevede una valutazione orale. Le esercitazioni di laboratorio prevedranno l'approfondimento di un argomento che sarà valutato e contribuirà in modo ponderato al voto finale.

Ultimo aggiornamento 06/10/2020 08:03