



**LAVORO IPERBARICO: Risultati della Ricerca INAIL-SAPIENZA
CONGRESSO BRIC 2019 Id31
Roma, 3 novembre 2022**



Influenza di profondità, temperatura e carico di lavoro sull'escrezione di metaboliti urinari dopo immersione: studio targeted e untargeted

Daniela Pigni

L'esposizione professionale all'atmosfera iperbarica si verifica nei lavoratori che svolgono la loro attività in ambienti in cui la pressione dell'aria respirabile è almeno del 10% superiore alla pressione al livello del mare.



L'aumento della pressione atmosferica implica:



- ❑ formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS)
- ❑ consumo di antiossidanti
- ❑ riduzione dell'attività enzimatica antiossidante



Causando danni al :

**DNA
RNA
Proteine
Lipidi**

Alterando il normale stato redox

L'equilibrio redox è essenziale per le funzioni fisiologiche



ROS (Reactive Oxygen Species) e RNS (Reactive nitrogen species)



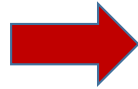
Sono Radicali liberi

In chimica si intende un atomo o un gruppo di atomi che si origina per rottura di un legame di valenza in modo tale che ciascuno dei due frammenti conserva il proprio elettrone di legame



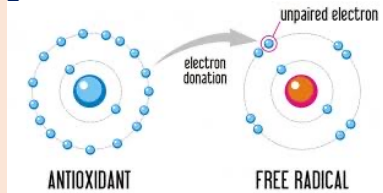
- radicale idrossidrilico $\cdot\text{OH}$ (può reagire con quasi tutte le molecole organiche)
- radicale superossido $\text{O}_2\cdot$
- perossido di idrogeno H_2O_2 (la cui molecola è in realtà un biradicale).
- radicale nitrossido $\cdot\text{NO}$ e anione perossinitrito ONOO^-

Stress ossidativo



Un fattore
di rischio
per la
salute

Lo stress ossidativo è uno squilibrio tra la produzione di **ROS (Reactive Oxygen Species)** e **RNS (Reactive nitrogen species)** e la capacità del sistema biologico di riparare il danno

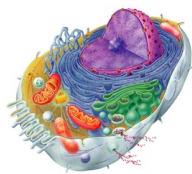


Il **danno ossidativo** avviene naturalmente, ma la sua frequenza aumenta con esposizione ad **agenti** che creano specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto

- ❑ esposizione di cellule o organismi a livelli elevati di O_2
- ❑ esposizione a livelli elevati di tossine che sono a loro volta specie reattive (ad esempio NO_2), o sono metabolizzati per generare specie reattive
- ❑ attivazione eccessiva di sistemi "naturali" che producono tali specie.
- ❑ Minimi livelli di antiossidanti

ROS ed RNS possono essere prodotti da:

❖ **Processi Metabolici**



❖ **Farmaci**

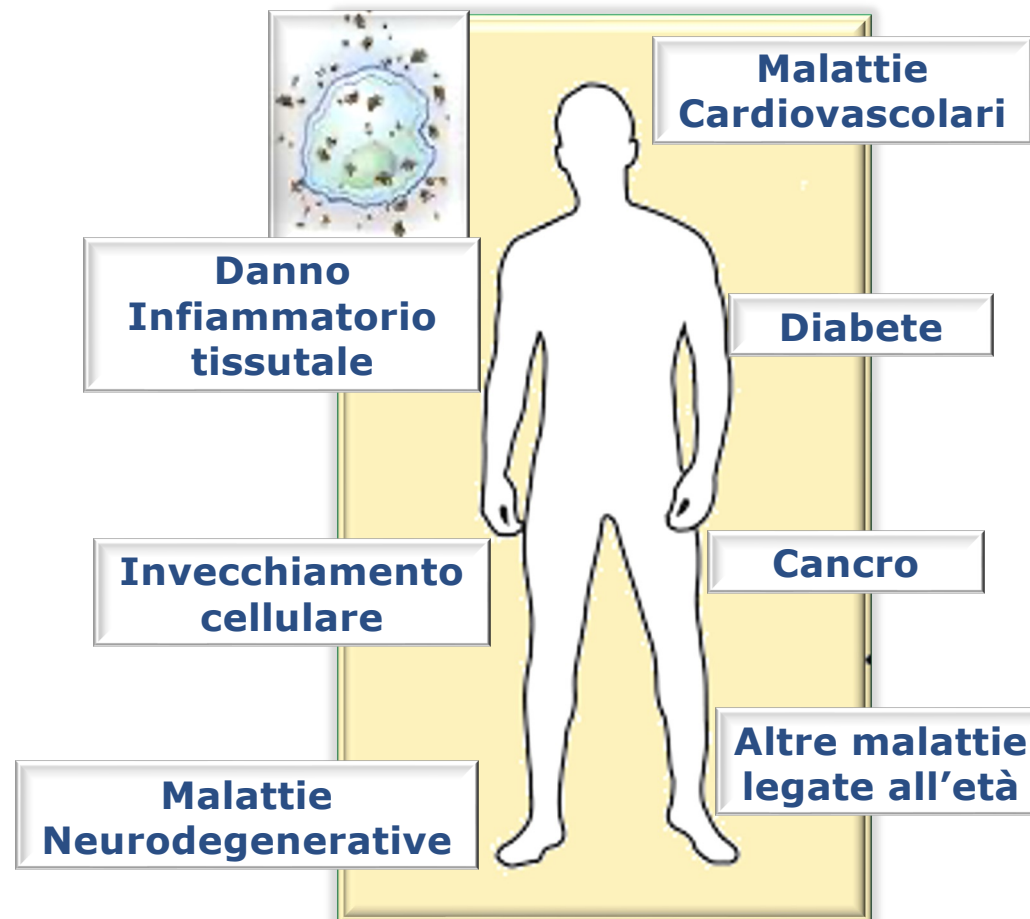


❖ **Stili di vita**

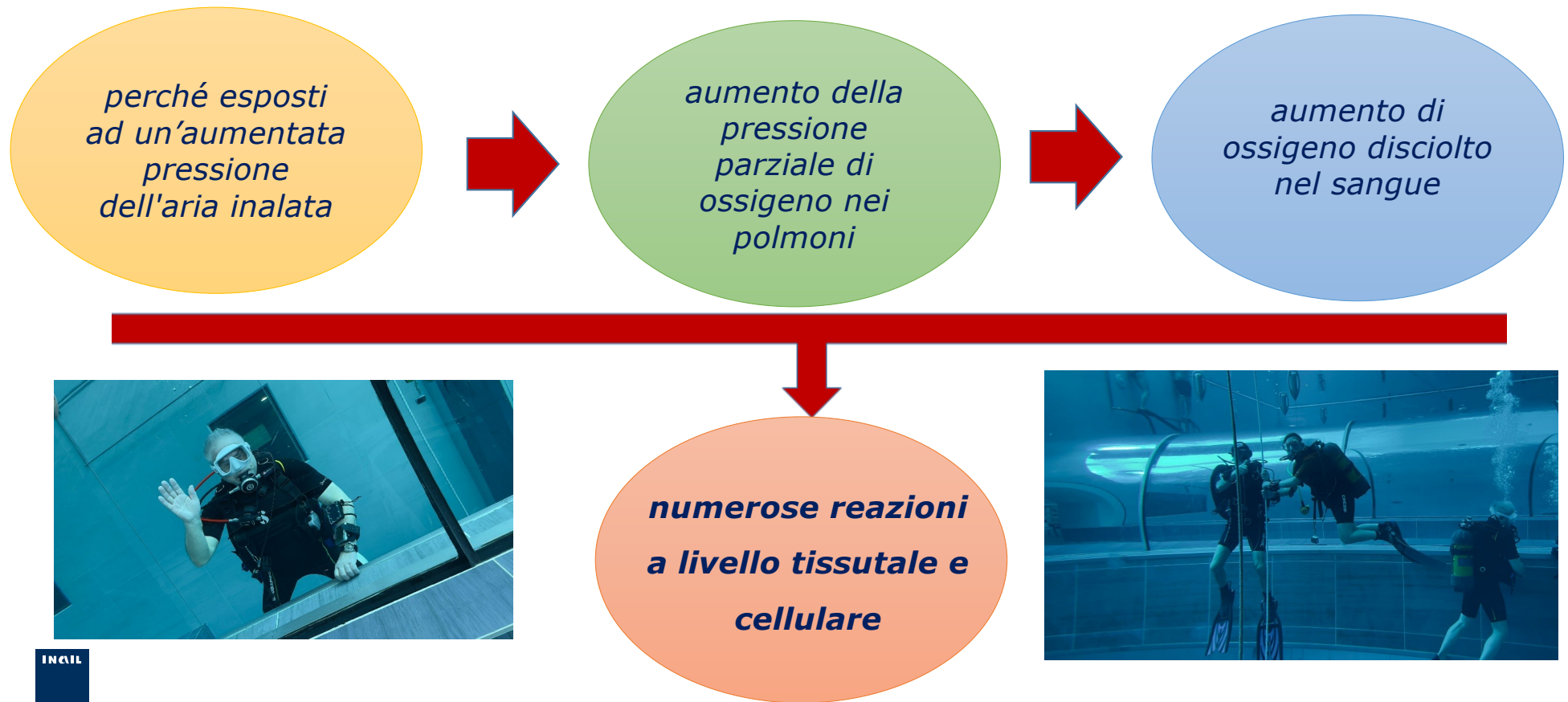


❖ **Inquinamento**

Effetti sulla salute



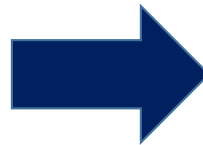
Nei subacquei che utilizzano autorespiratori (Scuba) è stato ipotizzato lo **stress ossidativo**



Scopo dello studio

- ❑ Stabilire la relazione tra esposizione iperbarica e alterazioni metaboliche dovute allo squilibrio dei ROS e degli RNS mediante la determinazione di biomarcatori urinari di danno ossidativo al DNA e all'RNA e proteine durante una sessione di immersione controllata.
- ❑ Valutare l'effetto della profondità e della temperatura dell'acqua sull'escrezione dei biomarcatori di stress ossidativo e di altri metaboliti nei subacquei

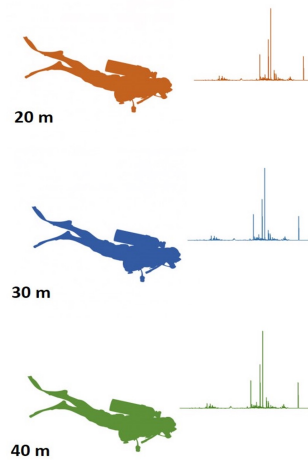
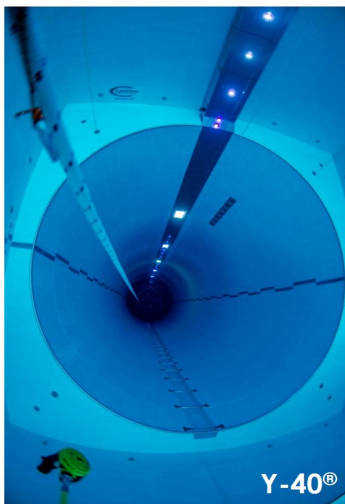
**variabili
che possono
suscitare
risposte metaboliche**



- ✓ **Profondità**
- ✓ **Durata dell'immersione**
- ✓ **Temperatura dell'acqua**
- ✓ **Carico di lavoro**

Esperimento

- Immersione controllata in piscina coperta per immersioni (Y-40®) a Montegrotto Terme (PD).
- Temperatura: temperatura di acqua termale di 32°C
- Profondità : 20, 30 e 40 metri
- Tempo: 3 diversi giorni



Soggetti

- 5 sub di età compresa tra 54-69 anni, non fumatori
- mute identiche e profilo di immersione controllato tramite un computer subacqueo individuale (Galileo Sol, Scubapro Uwaterc, California, USA)
- Il livello di profondità mantenuto tramite un giubbotto ad assetto variabile (GAV).
- Il gas respirato: aria atmosferica compressa.
- La velocità di risalita: 10 metri al minuto.
- Soggetti rimasti sul fondo per 30 minuti, completamente fermi.
- Le immersioni sono state randomizzate rispetto alla profondità nei tre giorni



I Campioni di urina sono stati prelevati

- ❑ prima dell'immersione (T1)
- ❑ immediatamente dopo (T2)
- ❑ tre momenti successivi all'immersione (T3,T4,T5)

Concentrazione di biomarcatori di stress ossidativo in **HPLC/ MS-MS**

8-oxoGua

8-oxodGuo

8-oxoGuo

3-NO₂Tyr

5-MeCyt

I livelli di metaboliti sono stati espressi come µg/g di creatinina

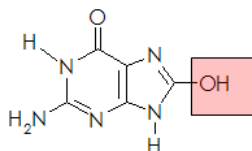
Analisi metabolomica con risonanza magnetica nucleare (**¹HNMR**)

Lo studio metabolomico NMR è stato applicato alle aliquote degli stessi campioni raccolti per il campione target

I livelli di metaboliti sono stati espressi come µmol/mmol di creatinina

Numero di soggetti			
Profondità	Giorno 1	Giorno 2	Giorno 3
A / 20 m	3	2	-
B / 30 m	-	-	4
C / 40 m	2	3	-

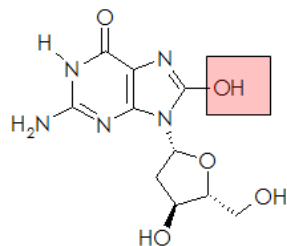
BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO STUDIATI (Biomarcatori di effetto)



8-idrossiGuanina (8-oxoGua)

DNA e RNA

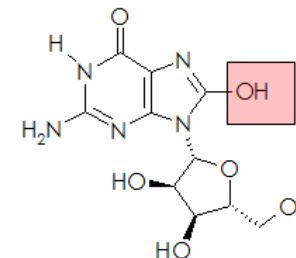
- ❑ Subisce più facilmente un attacco ossidativo, poiché ha il potenziale di ossidazione più basso.
- ❑ Ossidrilazione in posizione 8



8-idrossi-2'-deossi-Guanosina (8-oxodGuo)

DNA

- ❑ Biomarcatore più spesso studiato per il danno ossidativo al DNA.
- ❑ Originato dai diversi meccanismi di riparazione e/o turnover degli acidi nucleici

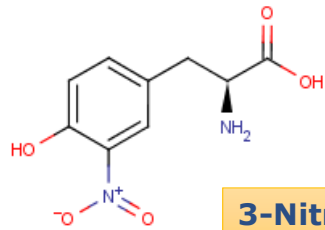


8-idrossiGuanosina (8-oxoGuo)

RNA

- ❑ Derivato extracellulare della guanina ossidata
- ❑ Non esistono meccanismi di riparazione, solo turnover
- ❑ E' a singolo filamento, le basi sono facilmente accessibili a ROS, perché meno protette dal legame con l'idrogeno
- ❑ E' più vulnerabile allo stress ossidativo rispetto al DNA

BIOMARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO STUDIATI (Biomarcatori di effetto)



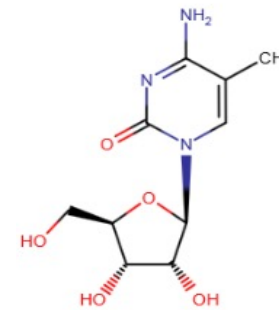
3-Nitro-L-Tirosina (3-NO₂Tyr)

PROTEINE

- ❑ Generata dalla nitratura della tirosina.
- ❑ Si forma per reazione con il monossido di azoto (NO) o l'anione perossinitrito (NO₂⁻).



- ❑ Biomarcatore per lo studio dell'ossidazione / nitratura in vivo delle proteine.



5-MetilCitidina (5-MeCyt)

RNA

- ❑ E' prodotto della metilazione della citidina;
- ❑ E' un marcatore epigenetico del danno all'RNA.
- ❑ E' presente in tutte le specie di RNA e ne influenza la struttura e le funzioni;

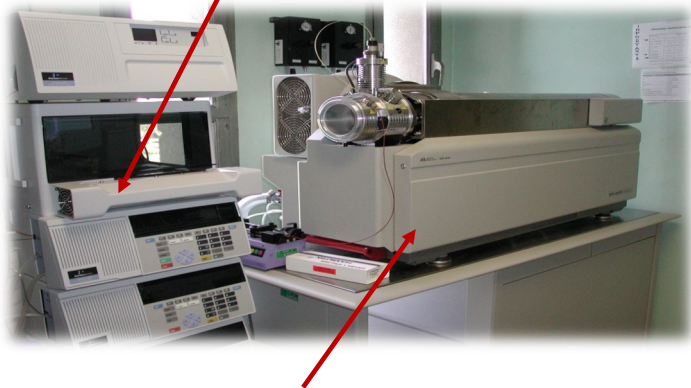
Livelli ridotti di questo nucleoside modificato sono associati a vari tumori.

Il monitoraggio biologico

✓ **Matrice: Urina.** Analisi in HPLC-MS/MS

HPLC

Series 200 LC (PerkinElmer)



AB/Sciex API 4000 triple-quadrupole



✓ **BIOMARCATORI:**

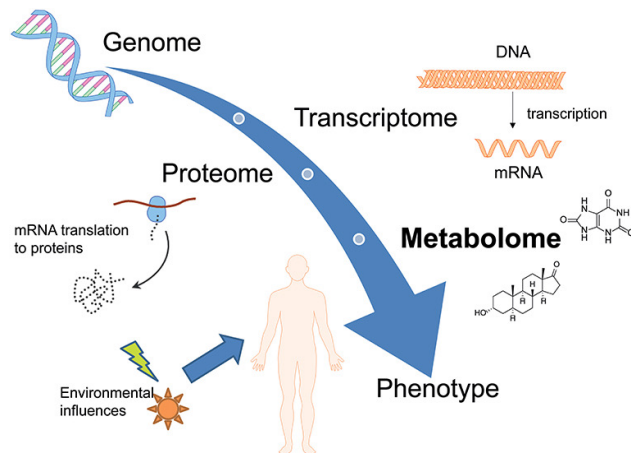
8oxoGua, 8-oxodGuo, 8-oxoGuo, 3-NO₂Tyr e e 5-MeCyt

✓ **CREATININA urinaria:** test colorimetrico (metodo Jaffè), quale fattore di normalizzazione per il diverso grado di diluizione dei campioni di urina (g/L o mmoli/L) **risultati sono espressi in rapporto con la concentrazione della CREATININA urinaria.**

Metabolomica NMR

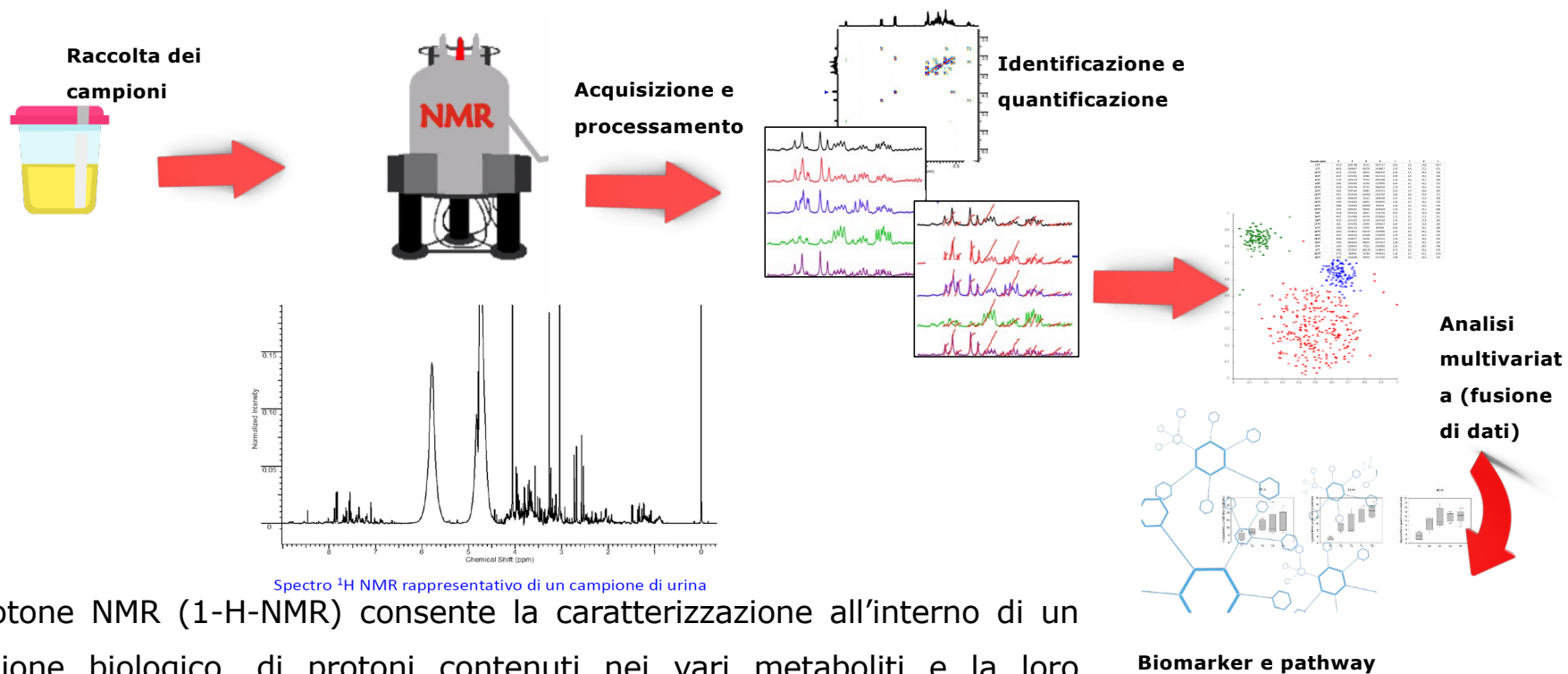
La «**Metabolomica**» è un campo analitico che consente di rilevare un gran numero di piccole molecole in fluidi o tessuti corporei fornendo un profilo completo dei metaboliti a basso peso molecolare presenti in un campione, generando uno spettro caratteristico attraverso la Spettroscopia NMR.

Le fluttuazioni dei metaboliti riflettono la risposta dell'organismo a farmaci, dieta, stile di vita, ambiente, stimoli e modulazioni genetiche

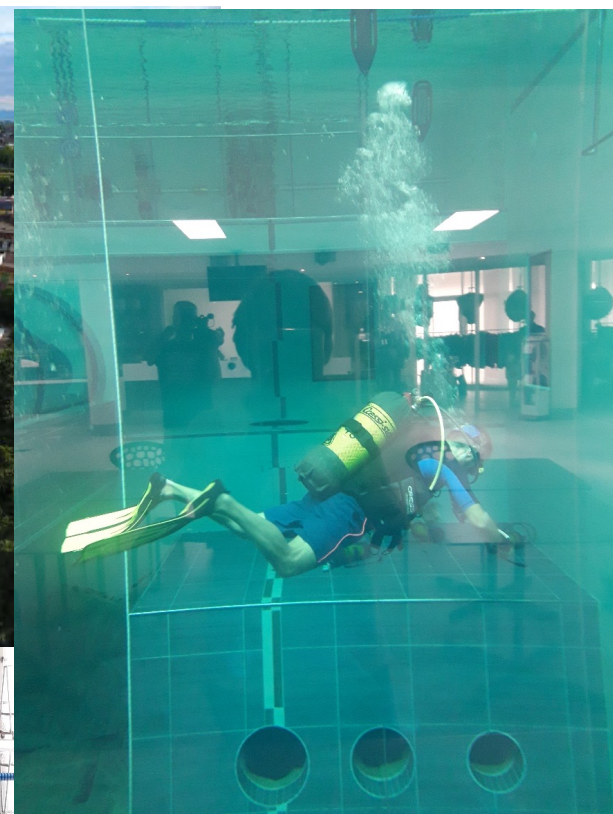


- ☑ **Meccanismi che possono portare alla malattia**
- ☑ **Esposizione a bassi livelli di xenobiotici**
- ☑ **Panoramica completa degli effetti dell'esposizione**

Flusso di un'Analisi Metabolomica basata su NMR



Il protone NMR (1-H-NMR) consente la caratterizzazione all'interno di un campione biologico, di protoni contenuti nei vari metaboliti e la loro rappresentazione in uno spettro.



INAIL

RISULTATI

Daniela Pigni

Risultati dei biomarcatori di stress ossidativo

8-oxoGua µg/g creatinina

Metri	A 20	B 30	C 40
Time	Media		
T1	35,29	14,37	31,99
T2	48,29	19,72	37,63
T3	18,99	12,08	33,46
T4	17,69	16,53	22,92
T4	17,76	16,41	28,59

8-oxodGuo µg/g creatinina

Metri	A 20	B 30	C 40
Time	Media		
T1	16,26	3,11	9,03
T2	14,85	3,79	8,87
T3	14,80	4,40	8,66
T4	15,42	4,07	8,31
T4	26,85	4,04	10,26

8-oxoGuo µg/g creatinina

Metri	A 20	B 30	C 40
Time	Media		
T1	11,04	3,31	5,49
T2	8,71	3,53	1,17
T3	9,61	4,76	5,25
T4	10,86	3,98	4,98
T4	9,42	4,09	5,66

Risultati dei biomarcatori di stress ossidativo

3-NO₂Tyr µg/g creatinina

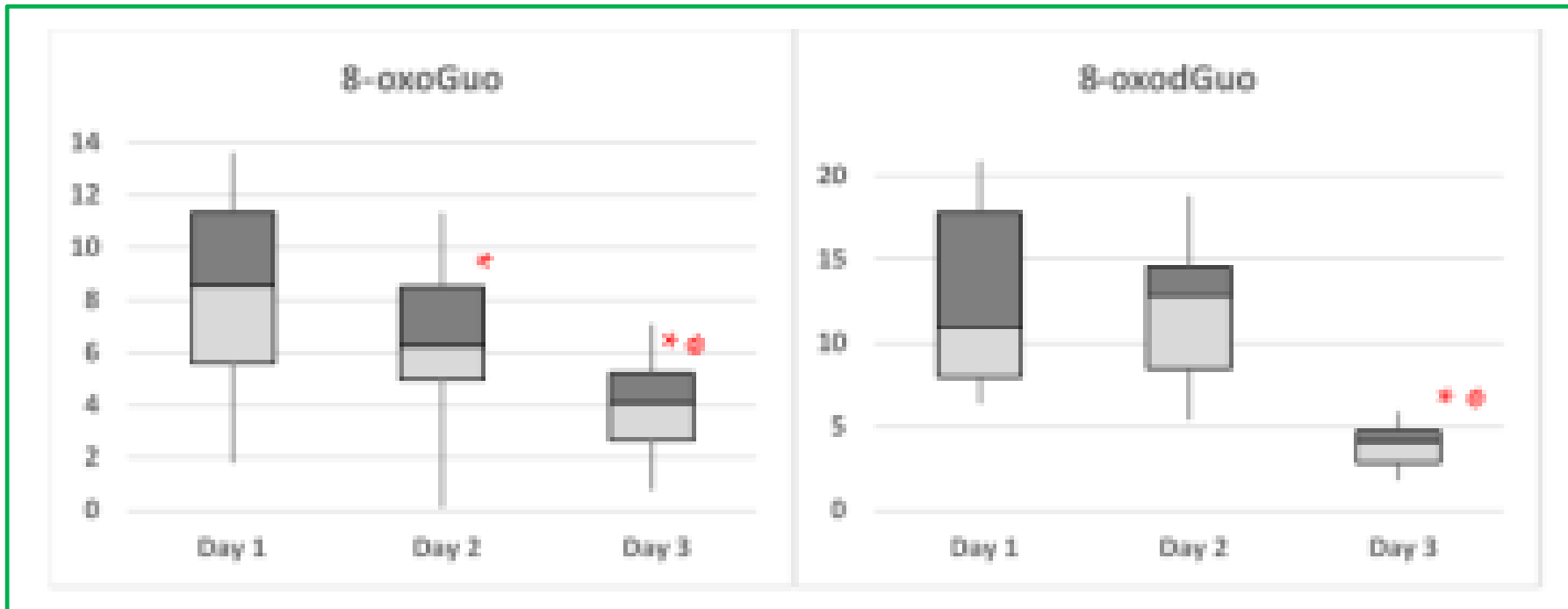
Metri	A 20	B 30	C 40
Time	Media		
T1	6,87	5,60	13,11
T2	16,27	8,92	33,71
T3	6,98	6,57	17,26
T4	9,60	12,18	11,34
T4	9,23	8,91	11,82

5-MeCyt µg/g creatinina

Metri	A 20	B 30	C 40
Time	Media		
T1	1,77	1,69	1,32
T2	1,74	2,05	1,13
T3	1,81	1,81	1,12
T4	2,06	5,42	1,00
T4	1,65	2,15	1,17

- Nessuna differenza statisticamente significativa tra i valori T1 e ciascuno degli altri punti temporali.
- Nessun effetto a lungo termine delle immersioni sui biomarcatori di stress ossidativo
- Nessuna differenza statisticamente significativa tra le tre condizioni
- Nessun effetto della profondità sugli indicatori di stress ossidativo

Andamenti di 8-oxoGuo e 8-oxodGuo nei 3 giorni



Box plots di 8-oxoGuo e 8-oxodGuo nei tre giorni di immersione
*valori significativamente inferiori rispetto al giorno 1 ($p < 0,01$)
@valori significativamente inferiori rispetto al giorno 2 ($p < 0,01$)

Risultati dall'analisi NMR

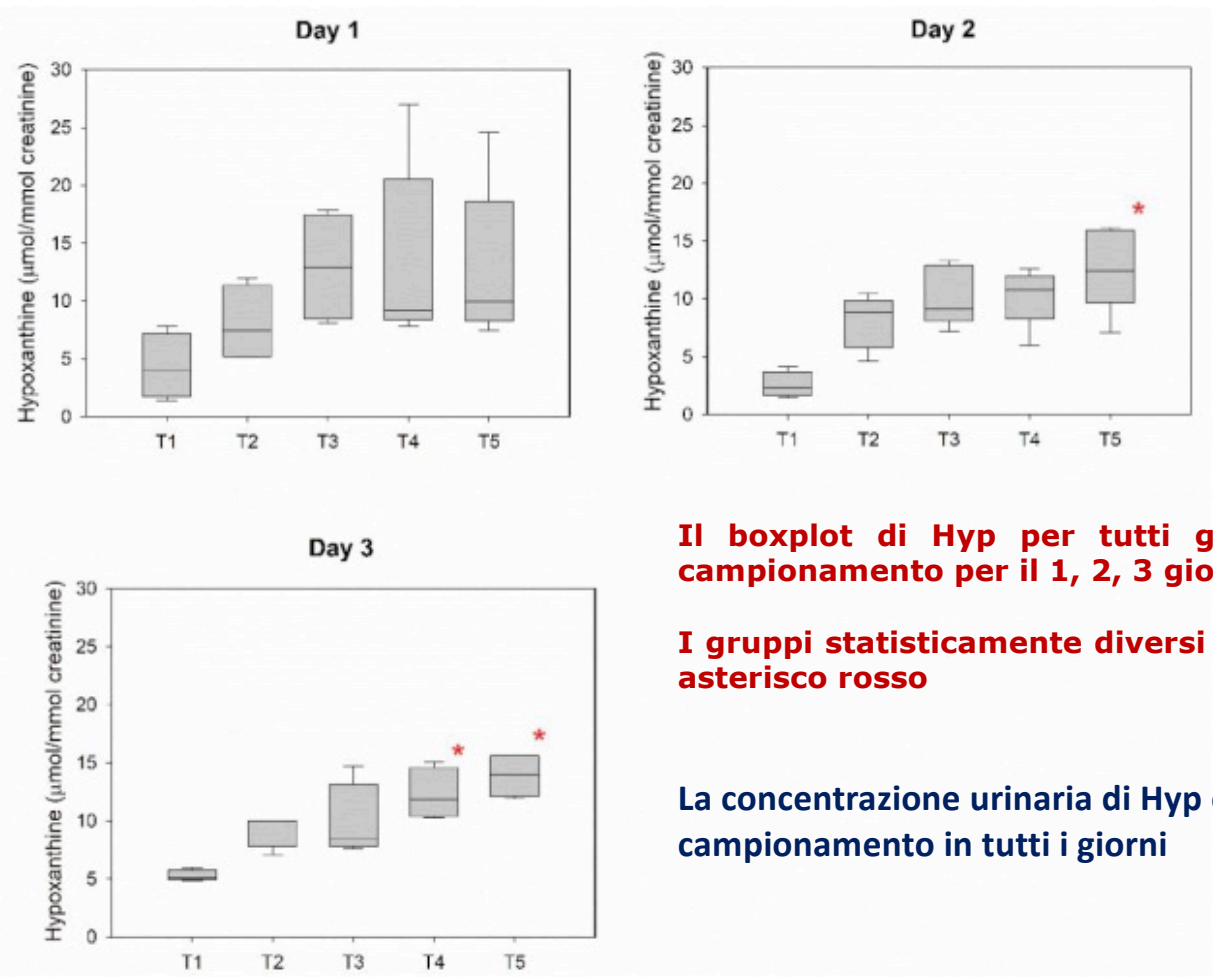
Dall'analisi qualitativa NMR sono stati identificati **36 metaboliti urinari** appartenenti a differenti classi chimiche quali **amminoacidi, acidi organici e composti azotati**.

1. Valina (Val)
2. Isoleucina (Ile)
3. Acido 3-Idrossiisobutirrico (3-HIBA)
4. Acido eritro-2,3-diidrossibutirrico (Erythro-2,3-DHBA)
5. Acido 3-idrossi-3-metilbutirrico (3-H-3-MB)
6. Lisina (Lys)
7. Acido Lattico
8. Treonina (Thr)
9. Acido 2-idrossiisobutirrico (2-HIB)
10. Alanina (Ala)
11. Acido Acetico
12. N-acetilglutammina (NAcGln)
13. Acido Piroglutammico (pyro-Glu)
14. Acido Succinico
15. Glutammina (Gln)
16. p-Cresol Solfato
17. Acido Citrico

18. Dimetilammina (DMA)
19. Sarcosina (Sar)
20. Creatina
21. Creatinina
22. Trimetilammine N-Ossido (TMAO)
23. Taurina (Tau)
24. Glicina (Gly)
25. Acido 4-Idrossifenilacetico(4-HPA)
26. Tyrosina (Tyr)
27. Acido 4-Idrossibenzoico (4-HBz)
28. Triptofano (Trp)
29. Fenilacetilglicina (PAG)
30. Acido Ippurico (Hipp)
31. Pseudouridina (PSI)
32. Ipoxantina
33. N1-Metil-2-piridone-5-carbossi ammido (2PY)
34. Acido Formico
35. U01
36. Trigonellina (Trig)



Hyp è un indicatore dell'adattamento dei processi energetici nelle diverse fasi dell'allenamento. I livelli urinari di Hyp sono correlati al metabolismo delle purine.



Il boxplot di Hyp per tutti gli individui nel tempo di campionamento per il 1, 2, 3 giorno di immersione.

I gruppi statisticamente diversi da T1 sono indicati con un asterisco rosso

La concentrazione urinaria di Hyp è aumentata durante i tempi di campionamento in tutti i giorni

Conclusioni

- ❑ Alla temperatura dell'acqua di 32°C, senza esercizio fisico, un'immersione di 30 minuti non produce variazioni significative sui livelli dei biomarcatori di stress ossidativo considerati, indipendentemente dalla profondità.
- ❑ La possibile variazione della concentrazione urinaria dei biomarcatori di stress ossidativo è all'interno del range di variabilità delle concentrazioni basali.
- ❑ Gli indicatori di stress ossidativo decrescono dal primo al terzo giorno, indicando un effetto di adattamento.
- ❑ Le variazioni giornaliere osservate suggeriscono un meccanismo fisiologico di adattamento metabolico ad una nuova condizione, dove la risposta del corpo umano all'impatto di un fattore di stress è più efficiente giorno per giorno, secondo un principio di ormesi.
- ❑ L'analisi metabolomica ha confermato l'aumento a tutte le profondità dell'ipoxantina urinaria, dovuta alla condizione iperbarica. Pertanto l'ipoxantina potrebbe essere considerata un biomarcatore sensibile all'esposizione iperbarica.

Altri Autori partecipanti al lavoro

Enrico Marchetti¹
Mariangela Spagnoli¹
Giovanna Tranfo¹
Flavia Buonauro²
Fabio Sciubba^{3,4}
Ottavia Giampaoli^{3,4}
Alfredo Miccheli^{3,4}
Alessandro Pinto⁵
Nazzareno De Angelis⁶
Luigi Fattorini⁷









International Journal of
Environmental Research
and Public Health



Article

Hyperbaric Exposure of Scuba Divers Affects the Urinary Excretion of Nucleic Acid Oxidation Products and Hypoxanthine

Enrico Marchetti ¹, Daniela Pigni ¹, Mariangela Spagnoli ¹, Giovanna Tranfo ^{1,*}, Flavia Buonauro ², Fabio Sciubba ^{3,4}, Ottavia Giampaoli ^{3,4}, Alfredo Miccheli ^{3,4}, Alessandro Pinto ⁵, Nazzareno De Angelis ⁶ and Luigi Fattorini ⁷

¹ INAIL – DIMEILA (Dipartimento Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro ed Ambientale) Monte Porzio Catone, Roma;

² Dipartimento di Chimica- Università la Sapienza (Roma)

³ NMR-Laboratorio di Metabolomica NMR Based (NMLab), Università la Sapienza (Roma)

⁴ Dipartimento di Biologia Ambientale, Università la Sapienza (Roma)

⁵ Dipartimento di Medicina Sperimentale -Università la Sapienza (Roma)

⁶ Unità di Ricerca Settore Subacqueo della Federazione Italiana Ambiente e Sport (FISA Sub)

⁷ Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer", Università la Sapienza (Roma)



*Grazie
per
l'attenzione!*