

Monitoraggio Biologico dell'esposizione professionale ad atmosfera iperbarica

INAIL

ISTITUTO NAZIONALE PER L'ASSICURAZIONE
CONTRO GLI INFORTUNI SUL LAVORO

Giovanna Tranfo⁽¹⁾, Mariangela Spagnoli⁽¹⁾, Daniela Pigni⁽¹⁾, Fabio Sciubba⁽²⁾,
Alberta Tomassini⁽³⁾, Giorgia Conta⁽²⁾, Luigi Fattorini⁽⁴⁾, Enrico Marchetti⁽¹⁾,
Alfredo Miccheli⁽⁵⁾

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

² Dipartimento di Chimica- Università la Sapienza (Roma)

³ Dipartimento di Biologia e Biotecnologia Charles Darwin - Laboratorio NMR, Università la Sapienza (Roma)

⁴ Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer" , Università la Sapienza (Roma)

⁵ Dipartimento di Biologia Ambientale -Laboratorio NMR, Università la Sapienza (Roma)

Il monitoraggio biologico

Il Monitoraggio Biologico è la misura di indicatori di esposizione nei fluidi biologici umani e fornisce informazioni integrate su tutte le esposizioni ambientali e occupazionali, per identificare e quantificare i potenziali rischi per la salute.

EPIDEMIOLOGIA dalla malattia all'esposizione – approccio tardivo

BIOMONITORAGGIO dell'esposizione –approccio preventivo

Il monitoraggio biologico dei lavoratori è la misura di indicatori di esposizione

- 1. Indicatori di dose**
- 2. Indicatori di effetto**
- 3. Indicatori di suscettibilità**

Indicatori biologici di dose



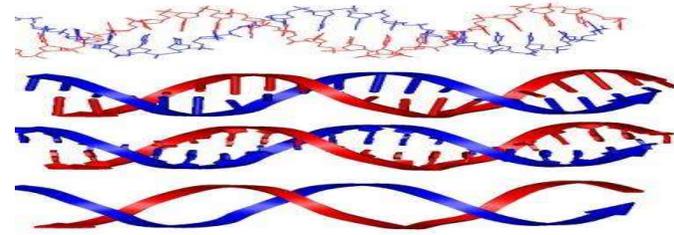
Indicano la dose di sostanza effettivamente assorbita dall'individuo nel corso dell'esposizione mediante la **misura della concentrazione in compartimenti biologici di soggetti esposti** (urine, sangue, saliva, capelli, aria espirata, ecc.) dello xenobiotico o di un suo metabolita o del prodotto dell'interazione del tossico/metabolita con un bersaglio biologico

Indicatori biologici di effetto

Permettono di identificare **un'alterazione precoce e reversibile** secondaria all'esposizione ad uno xenobiotico che si sviluppa nell'organo critico.



Indicatori biologici di suscettibilità



Esprimono differenze individuali,

di origine genetica (sesso, razza, modificazione in geni che controllano la attivazione metabolica o la detossificazione di una sostanza, in geni che controllano la riparazione del DNA o dei danni cellulari, in geni coinvolti nella predisposizione ad una specifica malattia)

o **acquisita** (dieta, stato di salute, stato socio-economico, età)

Tali differenze non si evidenziano in assenza di opportune sollecitazioni.

Il risultato è una limitata capacità dell'organismo di rispondere all'esposizione ad un determinato xenobiotico, e di conseguenza una ipersensibilità o un aumento della dose interna.

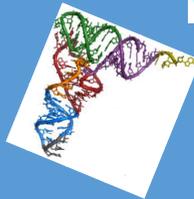
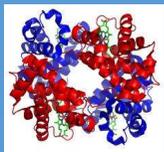
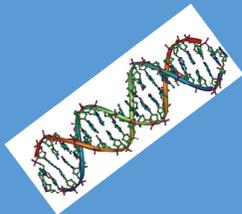
STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è uno squilibrio tra la produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) e la capacità del sistema biologico di riparare i danni.

Alterazioni del normale stato redox può danneggiare



LIPIDI, DNA, RNA, PROTEINE

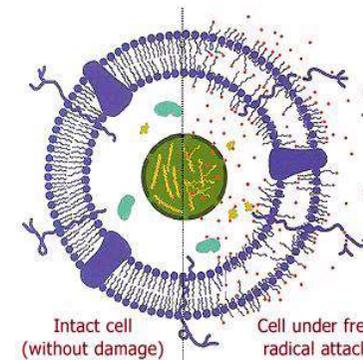


ROS possono essere prodotti da

❖ **Farmaci**



❖ **Inquinamento**



❖ **Metabolismo ed esercizio fisico**



❖ **Fumo ed Alcool**



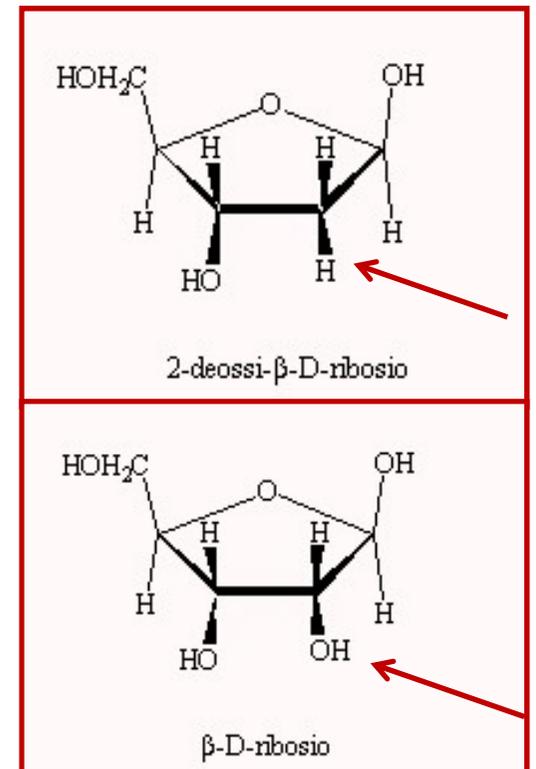
Acidi nucleici

Il DNA e l'RNA sono due macromolecole di struttura simile.

Filamento composto da un grandissimo numero di monomeri detti **nucleotidi**

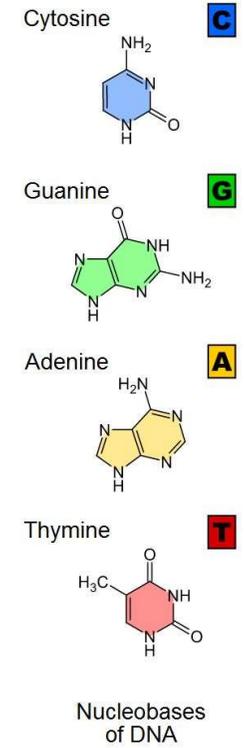
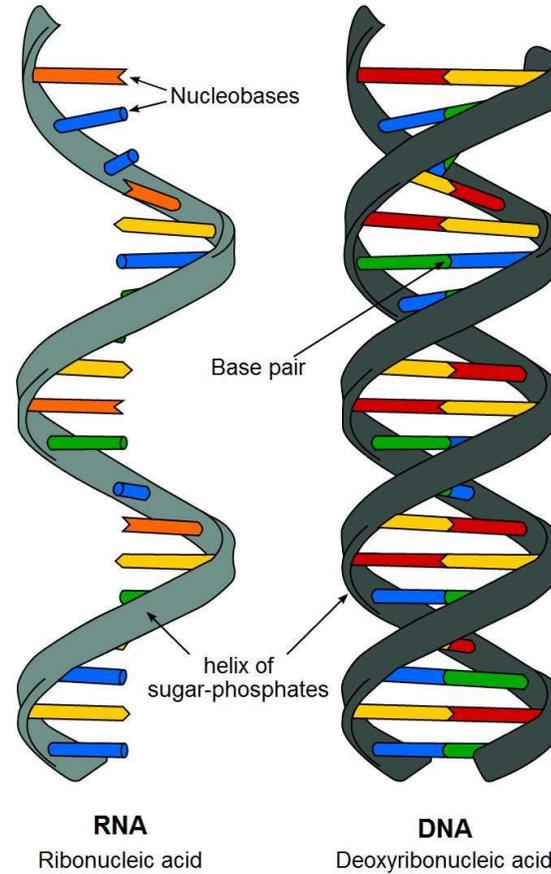
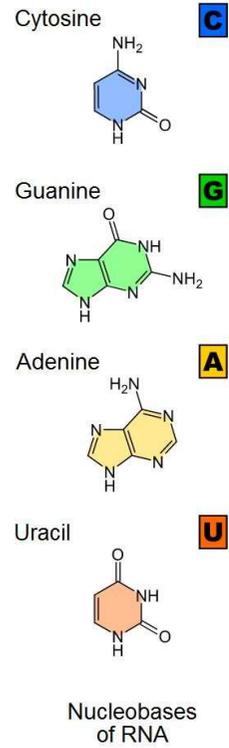
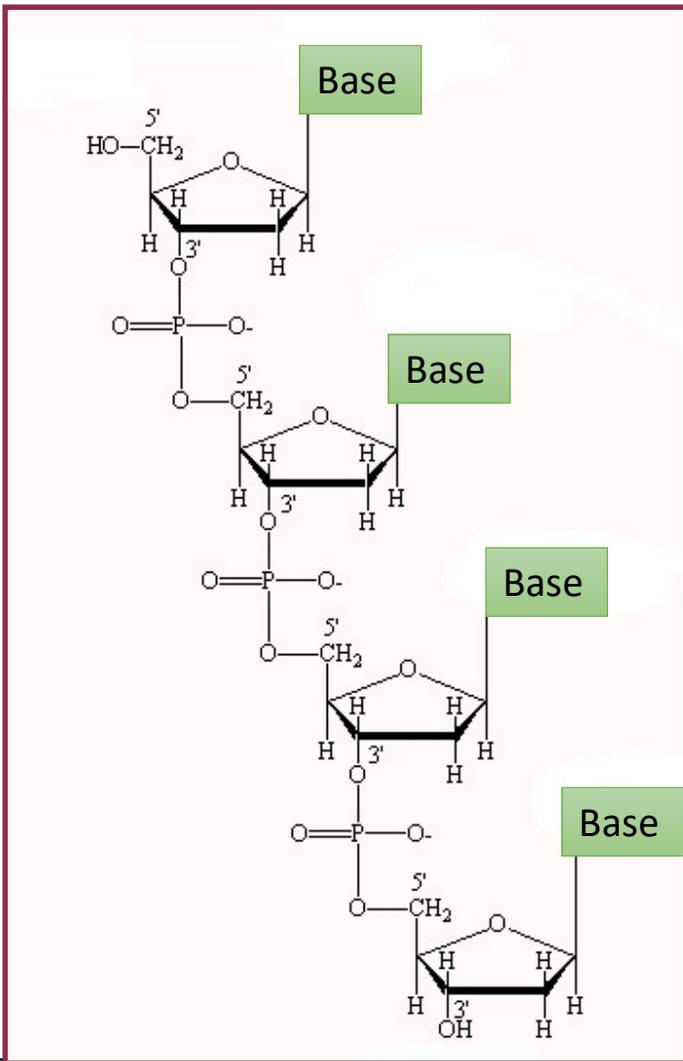
un nucleotide è formato da un **nucleoside + una base**

Basi		Nucleoside
Pirimidiniche	Puriniche	Base + Zucchero
Citosina DNA/RNA	Guanina DNA/RNA	Nucleotide
Timina DNA	Adenina DNA/RNA	Base + Zucchero + gruppo fosfato
Uracile RNA		



Nel DNA lo zucchero è il **deossiribosio**

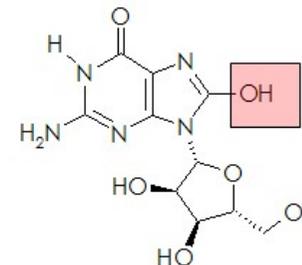
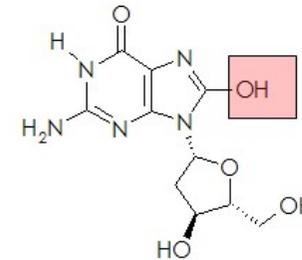
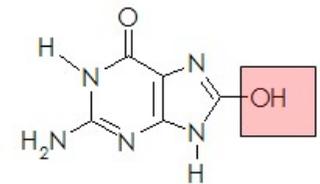
Nell'RNA lo zucchero è il **ribosio**



Danno al DNA e/o RNA

La base più suscettibile all'ossidazione è **la guanina**, poiché ha un basso potenziale redox, e la lesione più comune è l'ossidazione che avviene principalmente in posizione 8, con formazione di:

- ❖ **8-idrossiguanina (8-oxoGua)**, che rispecchia un danno ossidativo subito o dal **DNA** o dall'**RNA**
- ❖ **8-idrossi-2'deossiguanosina (8-oxo-dGuo)**, specifica di un danno ossidativo della guanina contenuta **nel DNA**.
- ❖ **8-idrossiguanosina (8-oxo-Guo)**, specifica di un danno ossidativo subito dalla guanina contenuta **nell'RNA**



Il DNA può essere riparato

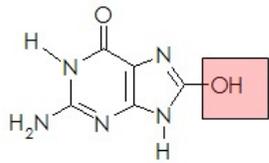
- ❑ **Riparazione per escissione(Excision Repair, **BER**) in cui la base o le basi danneggiate vengono rimosse e sostituite attraverso la nuova sintesi di DNA.**

I meccanismi di riparazione utilizzano enzimi specializzati

L'RNA è più vulnerabile allo stress ossidativo rispetto al DNA, perché:

- è a singolo filamento, le basi sono facilmente accessibili a ROS, perché meno protette dal legame con l'idrogeno
- Non ha sistemi di riparazione

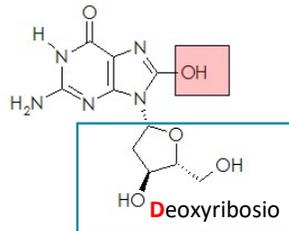
BIOMARCATORI di EFFETTO OSSIDATIVO



8-oxoGuanina

DNA and RNA

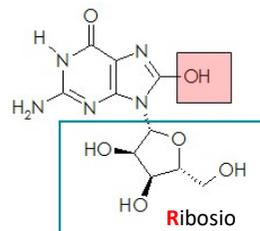
La guanina subisce facilmente un attacco ossidativo, in quanto è la base con il più basso potenziale di ossidazione e l'ossidazione si verifica in posizione 8, con separazione o meno della porzione di zucchero.



8-oxodeossiGuanosina

DNA

Il biomarcatore più spesso studiato per il danno ossidativo al DNA, originato dai diversi meccanismi di riparazione e / o turnover degli acidi nucleici



8-oxoGuanosina

RNA

Derivato extracellulare della guanosina ossidata, non esistono meccanismi di riparazione, solo turnover



3-Nitro-L-Tirosina

Proteine

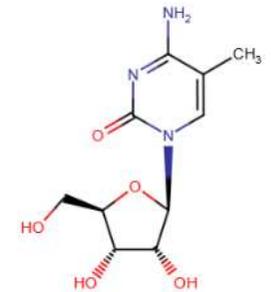
Si forma a seguito di una reazione con monossido di azoto (NO) o anione perossinitrito (NO_3^-)



L- Tirosina

Amminoacidi

Il suo prodotto di ossidazione è un marker di danno da radicali diretti a proteine / amminoacidi



5-MetilCitidina

RNA

Nucleoside modificato derivato da 5-metilcitosina

STUDIO PILOTA



Età	Altezza (m)	Peso (kg)	BMI
media	media	media	media
54,33	1,73	86,83	29,0
Dev Std	Dev Std	Dev Std	Dev Std
7,66	0,08	16,33	4,6



Sono stati monitorati 6 soggetti

- **«QUESTIONARIO PER LA VALUTAZIONE DEGLI ELEMENTI DI RISCHIO CONNESSI ALL'ATTIVITÀ SUBACQUEA»**
- ***Campione di urina prima e dopo attività iperbarica***



IMMERSIONE A SECCO



- **11:30** - Ingresso nella camera iperbarica e AVVIO del cardiofrequenzimetro
- **11:34** - Inizio della *Compressione*
- **11:40** - Termine della *Compressione*
- **12:04** – *Profondità 3 s / m*
- **12:10** - Inizio della fase di sicurezza
- **12:14** –*Decompressione 3 s / m*
- **12:19** - Uscita dalla camera iperbarica



IMMERSIONE SUBACQUEA

Immersione nel lago di Bracciano degli stessi sei soggetti, per 30 minuti a una profondità di 20 metri.



Tempo di raccolta delle Urine	
	PRE
0	Inizio Immersione
	30 min
1	Fine immersione
2	90 min
3	4h (240 min)
4	8 h (480 min)
5	24 h (1440 min)



Il monitoraggio biologico

✓ **Matrice: Urina** prelevata al mattino in contenitori sterili, suddivisa in aliquote congelate a -20°C fino al momento dell'analisi.
Analisi in HPLC-MS/MS



✓ **NORMALIZZAZIONE:** i risultati sono espressi in rapporto con la concentrazione della **CREATININA urinaria**: test colorimetrico (metodo Jaffè-UV/Vis 490 nm), quale fattore di normalizzazione per il diverso grado di diluizione dei campioni di urina (g/L o mmoli/L)



ANALISI MEDIANTE HPLC-MS/MS

HPLC: Cromatografia liquida ad alte prestazioni

- ❑ Fase mobile liquida
- ❑ Fase stazionaria impaccata in una colonna costituita da particelle porose.
- ❑ Il flusso dell'eluyente è ottenuto esercitando una pressione relativamente elevata mediante apposite pompe.



HPLC

Series 200 LC (PerkinElmer)



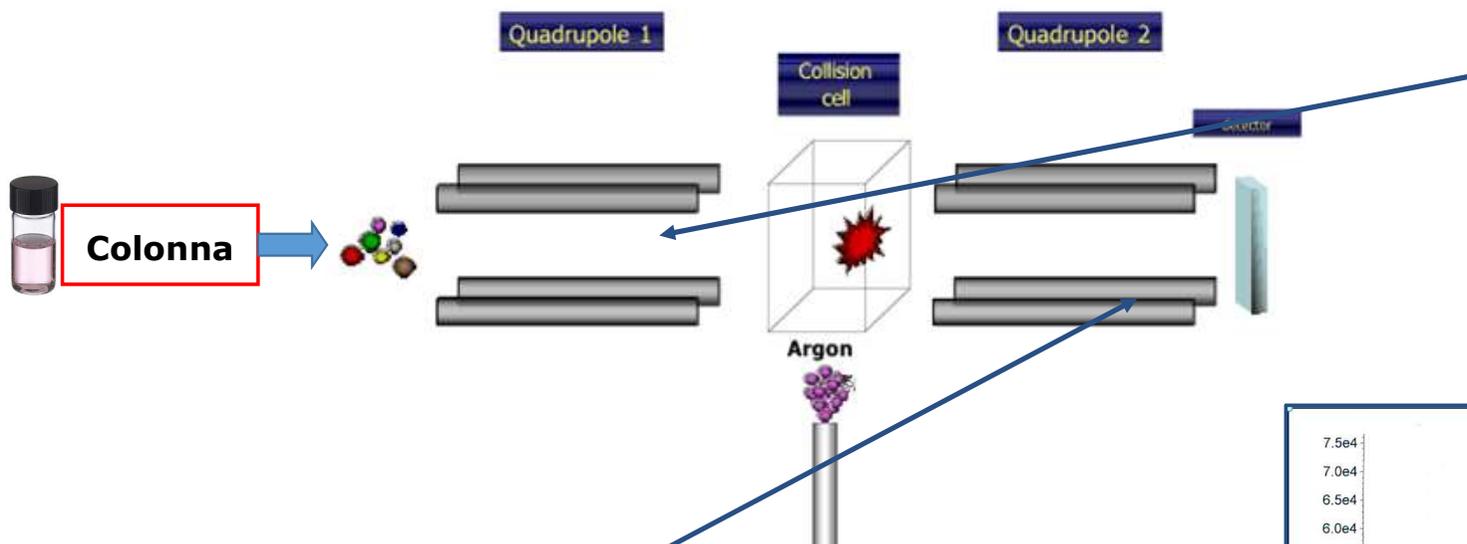
AB/Sciex API 4000 triple-quadrupole

Grandezze

- **Selettività** di un sistema cromatografico è la capacità di eluire sostanze diverse in tempi diversi. Dipende dalla temperatura e dalla natura delle due fasi.
- **Efficienza** è capacità di eluire una sostanza in una banda stretta

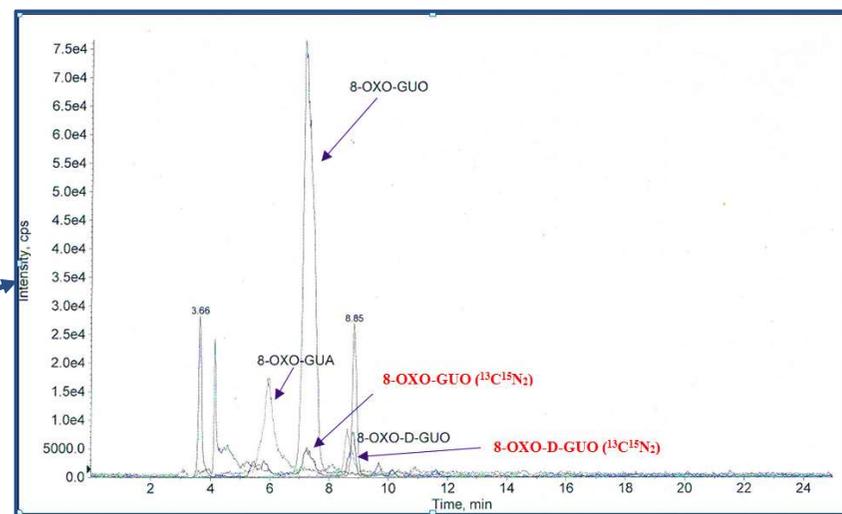


RIVELATORE MS/MS: Lo spettrometro di massa è uno strumento che produce ioni e li separa in fase gassosa in base al loro rapporto massa/carica (m/z).

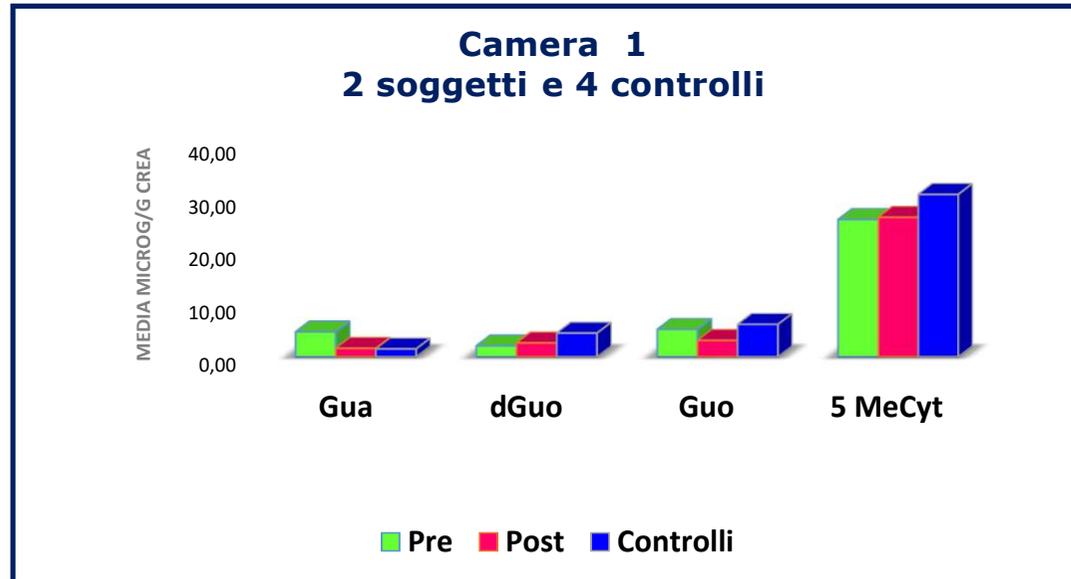


Le molecole del campione separate dal **primo filtro** non vengono rivelate all'uscita dai quadrupoli ma entrano in un **secondo quadrupolo** nel quale sono indotte ad una nuova frammentazione.

Il **secondo quadrupolo** effettua la separazione e la rivelazione degli ioni frammento prescelti con la tecnica detta rispettivamente **SRM** " (selected reaction monitoring)



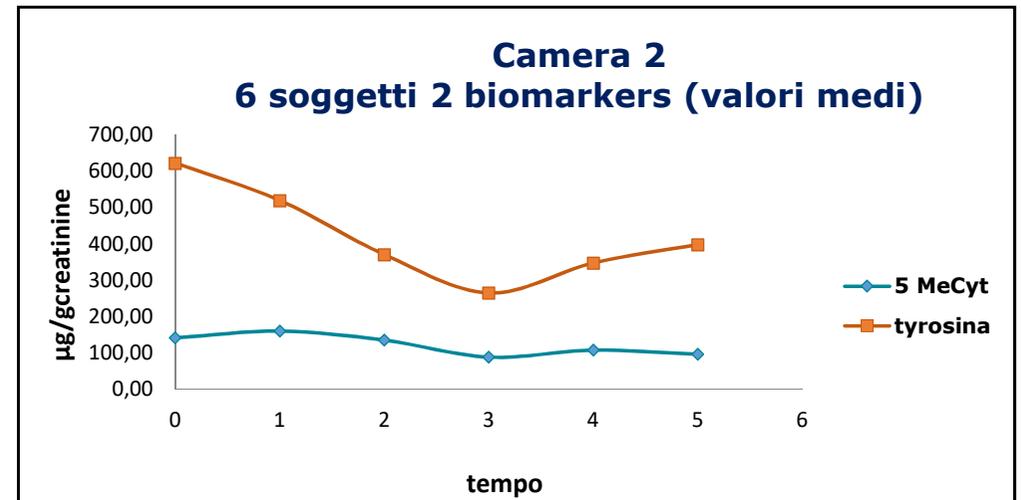
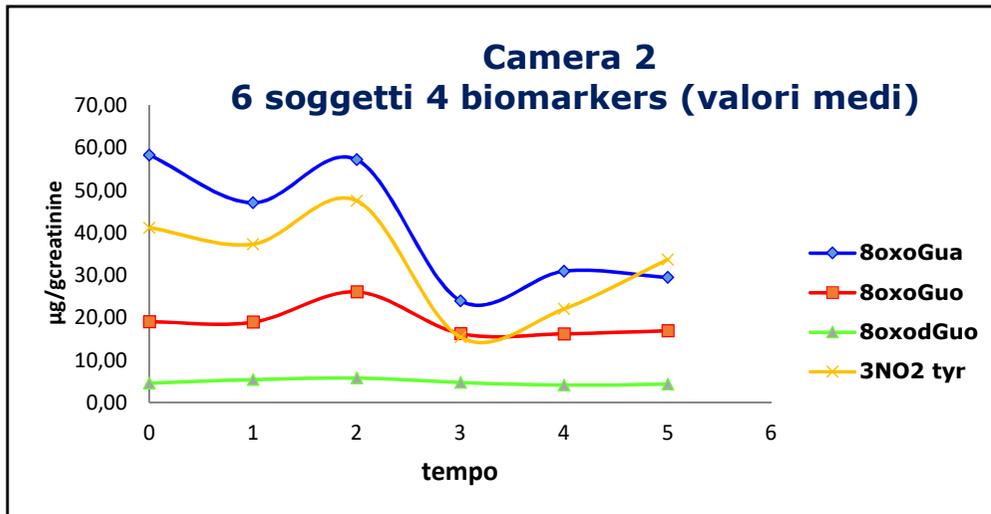
Risultati Camera Iperbarica 1



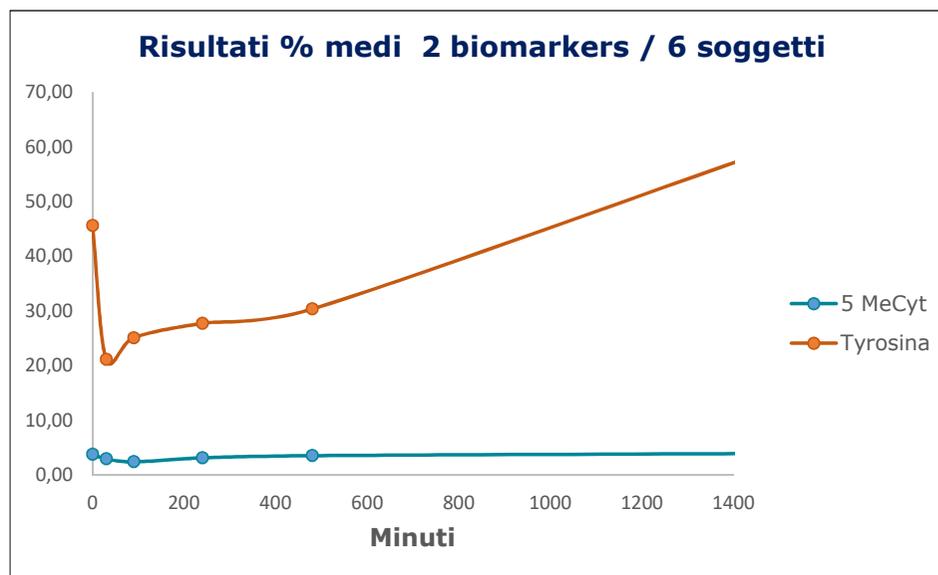
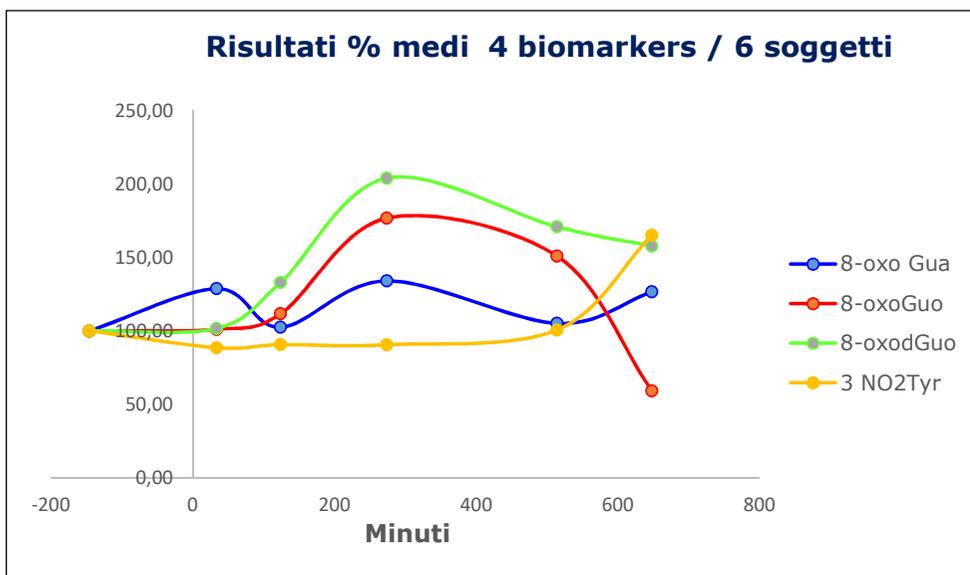
Nel primo esperimento nella camera iperbarica sono stati prelevati solo 2 campioni di urina, prima e dopo l'immersione, e sono stati monitorati 4 soggetti di controllo. Poiché non si sono evidenziate variazioni significative dei biomarcatori urinari dopo l'esposizione, è stato deciso di estendere il campionamento delle urine fino a 24 ore.

Risultati Camera Iperbarica 2

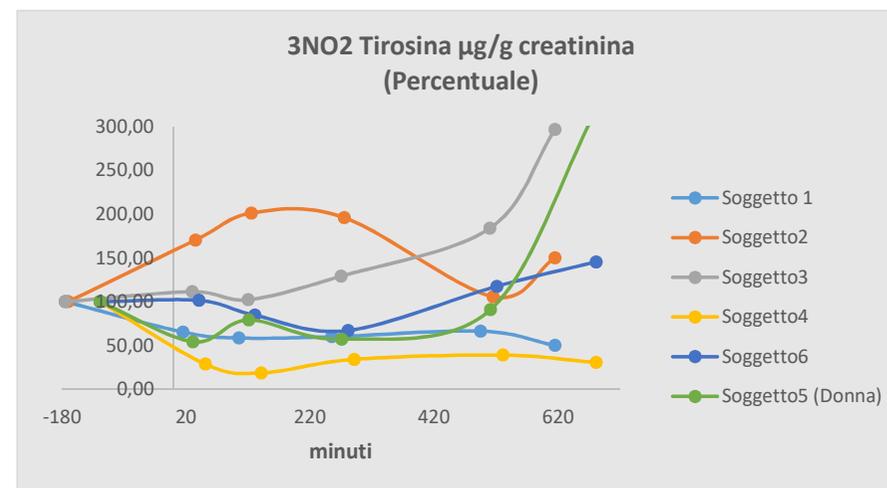
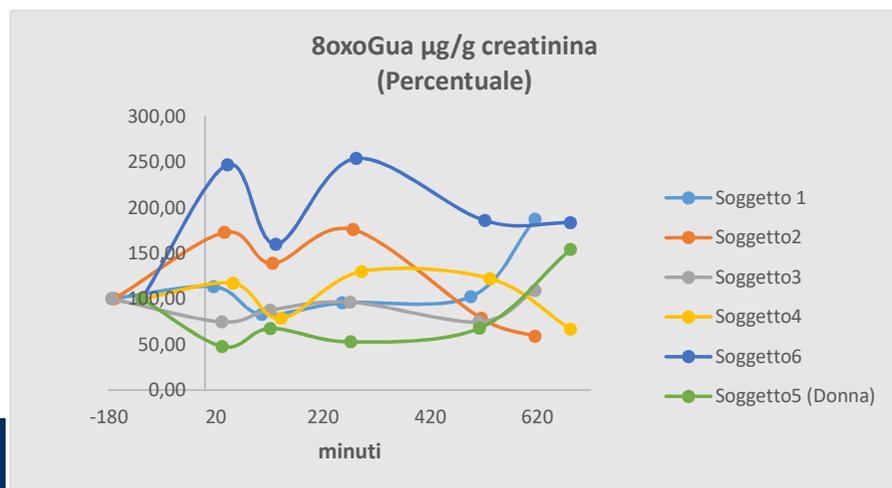
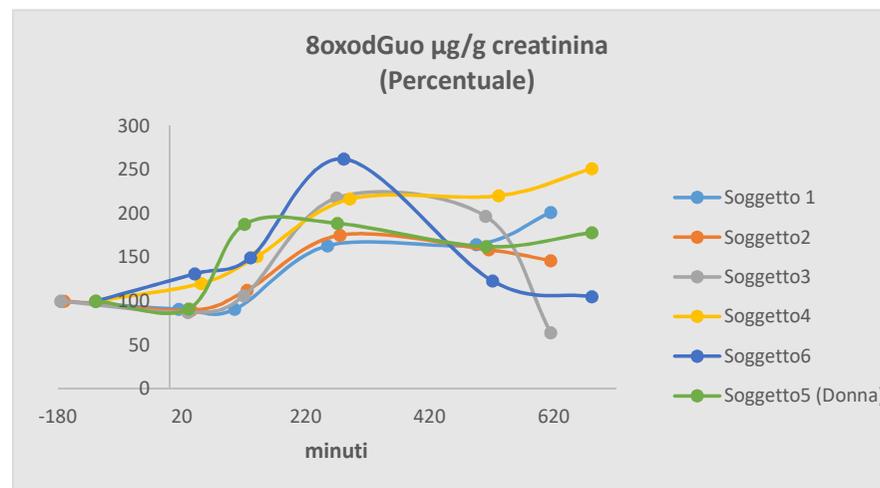
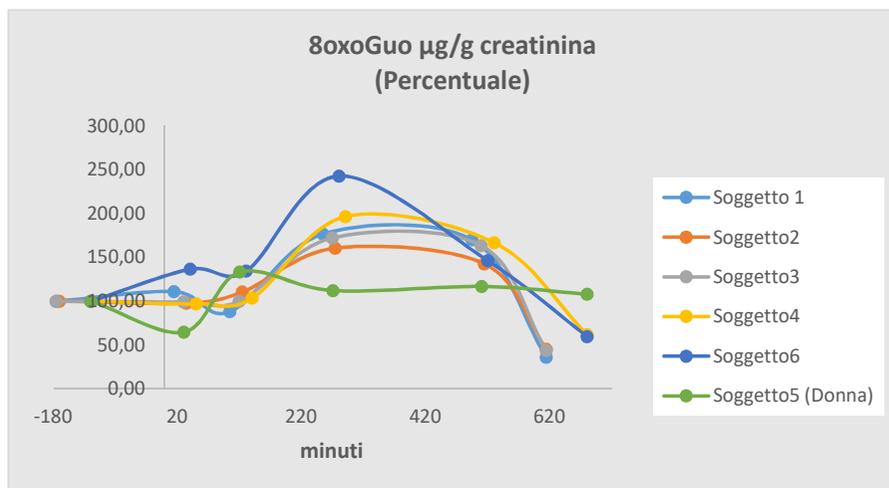
Ne gli esperimenti successivi sono stati prelevati 6 campioni di urina. I risultati hanno mostrato un aumento in 4 biomarcatori e una diminuzione negli altri due in tutti i soggetti dopo l'esposizione, raggiungendo un valore **massimo 4 ore circa dopo l'inizio dell'immersione**.



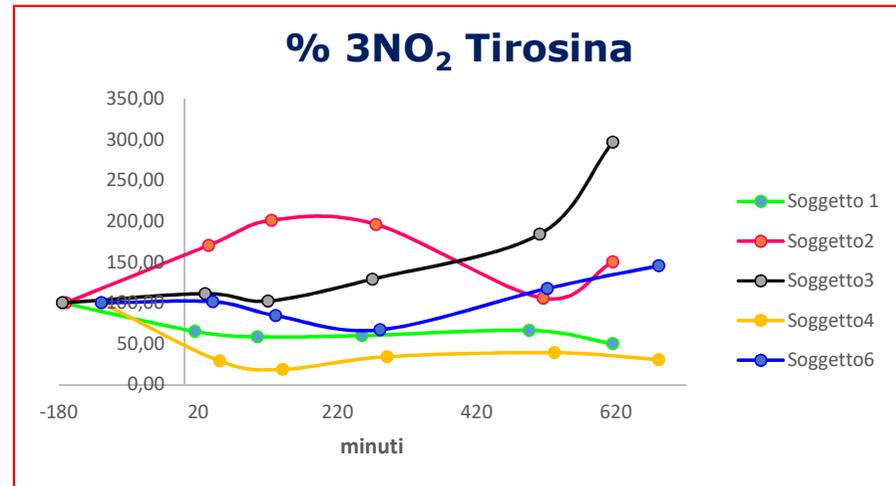
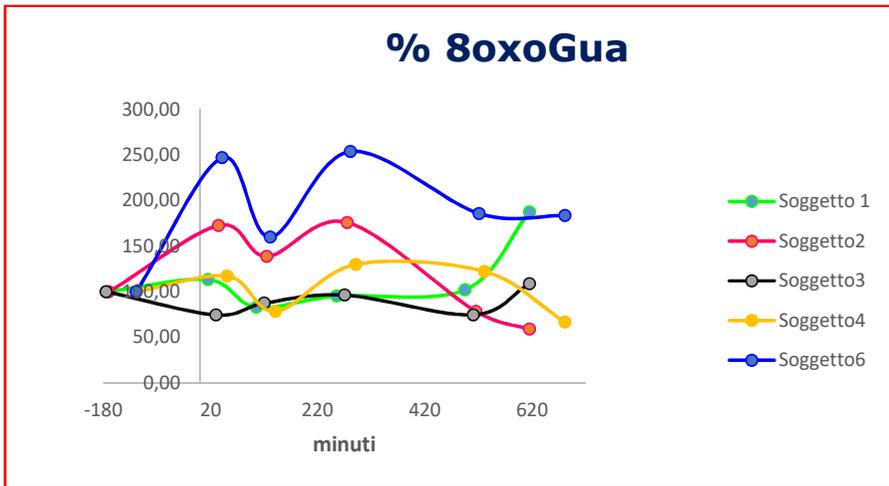
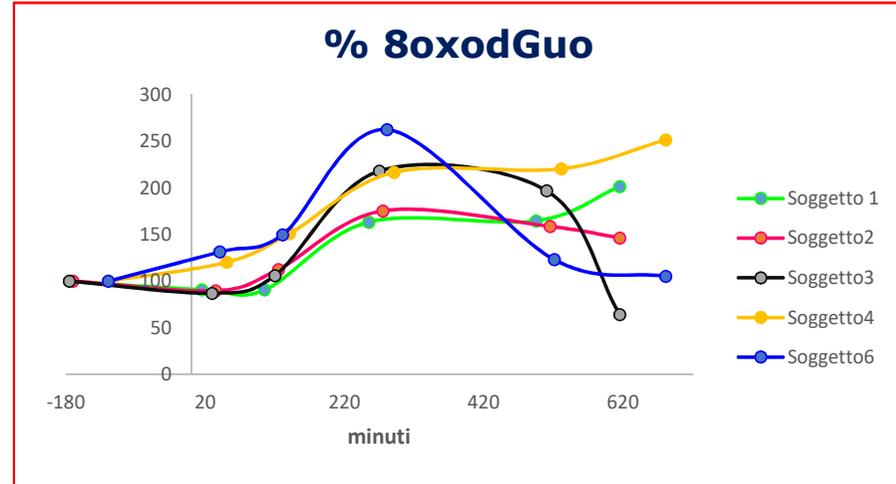
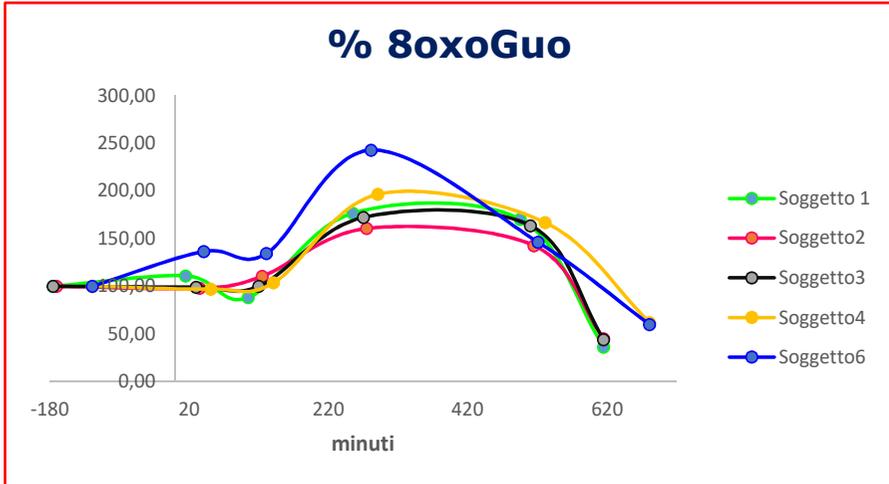
Risultati Immersione in Acqua 30 min 20 metri



Variazione temporale dei biomarkers (BM) per tutti i soggetti Immersione T=0, BM= 100%

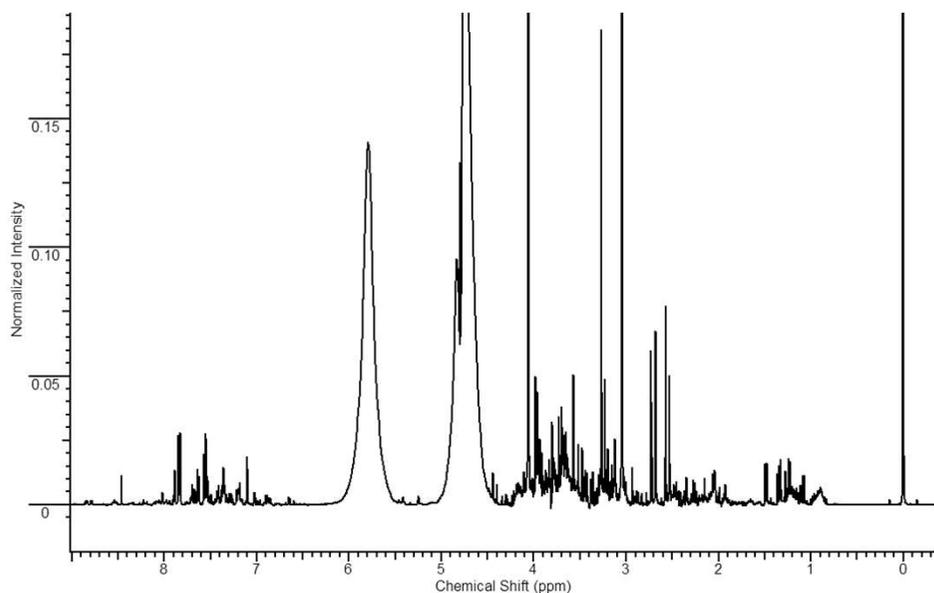


Variazione temporale dei biomarkers (BM) per ogni soggetto (solo maschi) Immersione T=0, BM= 100%



APPROCCIO METABOLOMICO

“La "metabolomica" è un campo emergente che consente il rilevamento di un gran numero di piccole molecole in fluidi o tessuti corporei in un unico passaggio fornendo un profilo completo dei metaboliti a basso peso molecolare presenti in un campione, generando uno spettro caratteristico di ciascuno metodo impiegato



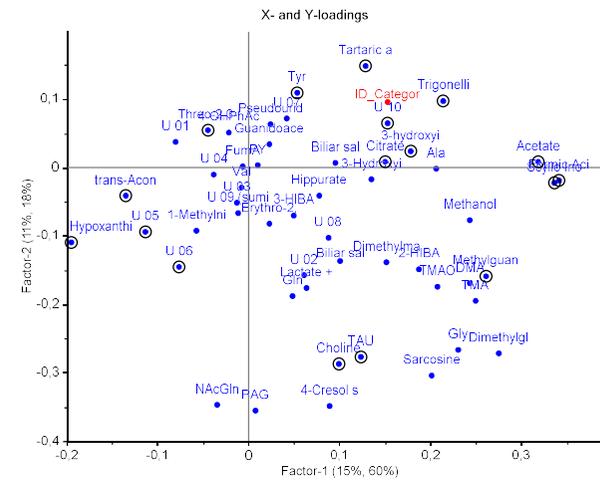
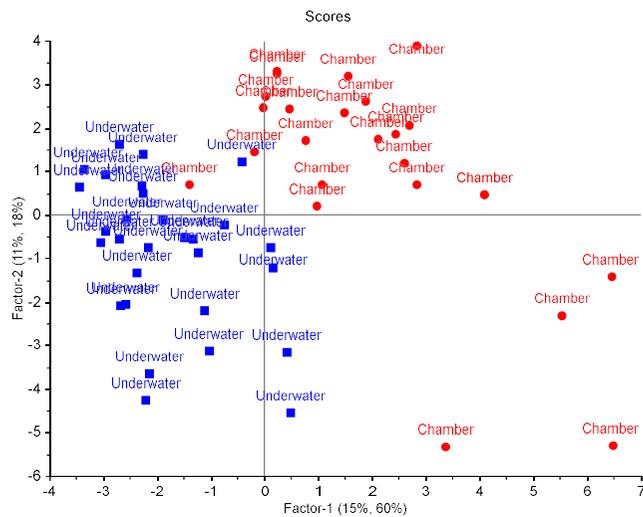
Spectro ^1H NMR rappresentativo di un campione di urina

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

È un metodo altamente **riproducibile**, **non selettivo**, **rapido e non distruttivo**, non richiede alcuna **preparazione del campione** e può essere **applicato all'analisi dei campioni di tessuto**.

I dati spettroscopici vengono quindi analizzati utilizzando **tecniche chemiometriche** e di **riconoscimento dei pattern** al fine di estrarre informazioni metaboliche latenti e consentire la classificazione e l'identificazione dei campioni biologici

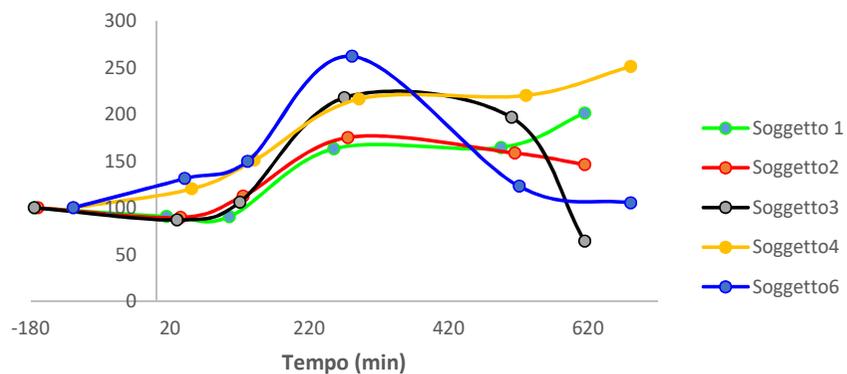
Il profilo metabolico urinario dei 5 soggetti di sesso maschile è stato studiato con spettroscopia ^1H NMR usando le urine prelevate prima dell'immersione, immediatamente dopo l'immersione e quindi a 90, 240, 480 e 720 minuti. L'analisi multivariata PLS, condotta sulle concentrazioni di molecole derivate dall'NMR, **ha mostrato una separazione tra i campioni dalla sessione subacquea e dalla camera iperbarica.**



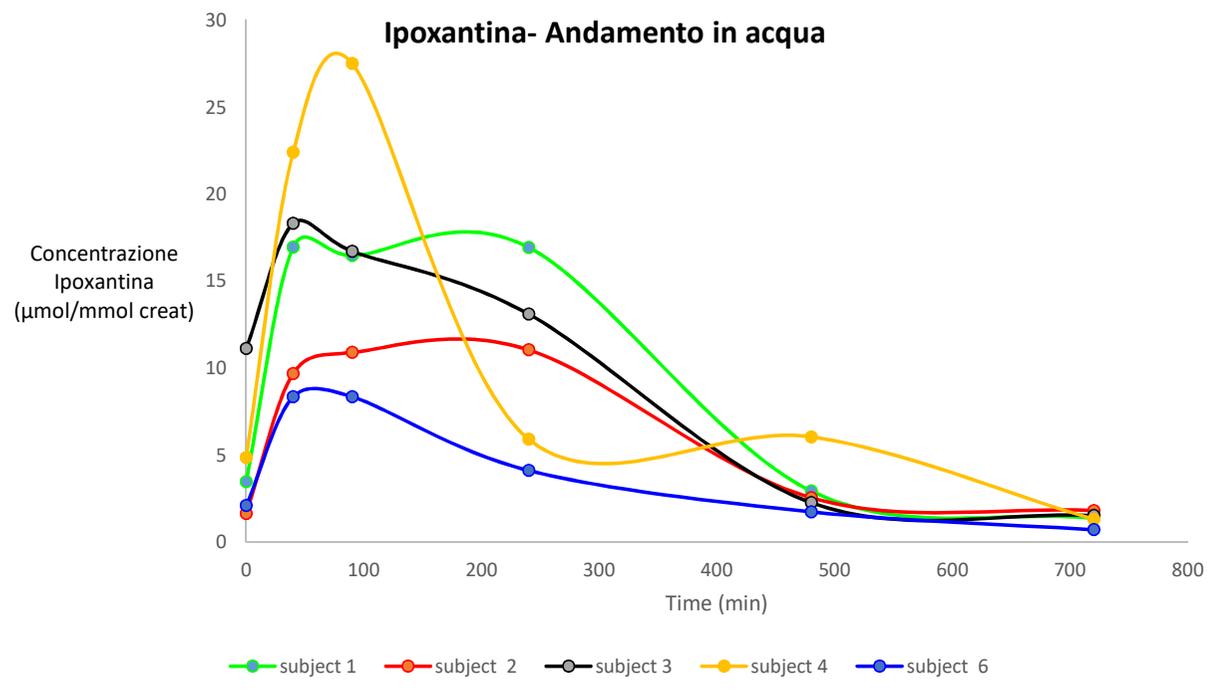
Le variabili più significative nei campioni di immersione erano acido eritro-2,3-diidrossibutirrico, colina, taurina e ipoxantina mentre acido 3-idrossiisovalerico, acido acetico, acido citrico, metilguanidina, scillo-inositolo, acido tartarico, tirosina, acido formico e la trigonellina erano significative nel modello di campione della camera iperbarica.

Andamento dell' Ipoxantina in immersione in acqua

% 8oxodGuo



Ipoxantina- Andamento in acqua



L' andamento dell'Ipoxantina in immersione in acqua assomiglia all'andamento dei markers di stress ossidativo

CONCLUSIONI

- I risultati ottenuti nella camera iperbarica e nell'acqua sembrano mostrare un effetto ritardato su tutti i biomarcatori considerati e per tutti i soggetti con un **picco dopo 3-4 ore**
- L'approccio mirato ha mostrato che **l'8-oxoGuo urinario e l'8-oxodGuo sono più alti con una differenza statisticamente significativa dopo 4 ore dall'immersione**
- **NMR ha confermato** questo effetto ritardato e ci ha permesso di discriminare molto bene tra le sessioni subacquee e quelle a secco e di identificare **l'ipoxantina come il miglior metabolita discriminante**
- Data l'elevata variabilità individuale, il confronto con i controlli non è significativo ma **ogni soggetto è il controllo di se stesso**



Grazie per l'attenzione!