

## ESPOSIZIONE AD ATMOSFERE IPERBARICHE: IPOTESI DI PROTOCOLLO DI RICERCA

**Enrico Marchetti<sup>(1, 4)</sup>, Agnese Martini<sup>(1)</sup>, Angelo Tirabasso<sup>(1)</sup>, Floriana Sacco<sup>(1)</sup>, Emilia Paba<sup>(1)</sup>, Antonella Mansi<sup>(1)</sup>, Giovanna Tranfo<sup>(1)</sup>, Giuseppe Filomeni<sup>(2,3)</sup>, Giuseppina Di Giacomo<sup>(2)</sup>, Maria Concetta D'Ovidio<sup>(1)</sup>**

<sup>1</sup>: INAIL DC Ricerca DiMEILA – Monte Porzio Catone – Roma

<sup>2</sup>: Università di Roma Tor Vergata – Dipartimento di Biologia

<sup>3</sup>: Cell Stress and Survival Unit - Danish Cancer Society Research Center

<sup>4</sup>: Università Sapienza di Roma – Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia “V. Erspamer”

### 1 - INTRODUZIONE

Il Decreto Legislativo 81/2008, che riunisce in un unico codice tutta la normativa in materia di salute e sicurezza sul lavoro, introduce il fattore di rischio da esposizione ad atmosfere iperbariche. Tale aspetto viene inserito tra i fattori di rischio fisici nel Titolo VIII ma non ne viene data alcuna indicazione sulla valutazione, come invece viene fatto per altri agenti di rischio. Tra le ragioni di tale omissione vi è quella per cui, mentre l'agente di rischio è palesemente un'osservabile fisica, la sua azione sulla probabilità di averne un detrimento è multifattoriale, spaziando dalla medicina iperbarica alla fisica dei gas disciolti, al microclima, etc.. Conseguentemente, una metodologia di valutazione non è stata ancora proposta né validata.

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è di studiare, da un punto di vista quantitativo, semiquantitativo e qualitativo, tutte le osservabili implicate nell'attività iperbarica, sia umida che a secco. Da questo studio, in casi ben definiti, si può ricavare uno schema di interazione e quindi una relazione causa-effetto approssimata, tale da consentire di attribuire una possibilità di valutazione del rischio. Tale sistema dovrebbe essere poi messo a confronto con dati epidemiologici sul campo. Infine si auspica di poter trovare un parametro unico che, in condizioni standardizzate definibili caso per caso, consenta di associare a detto parametro un livello di rischio nella valutazione ex art.15 del testo unico di sicurezza del lavoro.

Un simile progetto implica giocoforza la partecipazione di numerosi attori appartenenti a settori diversi, ciascuno in grado di apportare il proprio *know how* e di consentire il giusto approccio multidisciplinare necessario per la valutazione del rischio da esposizione iperbarica.

Questo articolo intende descrivere la fase di progettazione, di avvio del progetto di ricerca e le fasi di arricchimento verificatesi nel corso della stessa progettualità. Idee e professionalità diverse, ma tra loro complementari, hanno consentito di integrare le fasi iniziali e di sviluppo del progetto di studio; gli scenari di incidenti che purtroppo sono avvenuti e continuano a verificarsi sulle nostre coste rafforzano la necessità di considerare la valutazione del rischio da esposizione iperbarica ai fini della tutela della salute e sicurezza dei lavoratori.

## 2 – LA NATURA MULTIFATTORIALE DEL PROBLEMA

Il rischio da esposizione ad atmosfera iperbarica rappresenta una macrocategoria che include molti agenti di rischio: fisico, chimico, biologico e di sicurezza.

La prima necessità che si incontra nel definire il fattore di rischio consiste nello specificare quale atmosfera si vuole studiare. Per quanto riguarda il presente progetto di ricerca ci si occuperà esclusivamente di aria. Non verranno prese in considerazione altre atmosfere modificate con la sostituzione dell'azoto con altri gas inerti quali elio, ovvero con una alterata percentuale di azoto rispetto all'aria atmosferica. Inoltre, come ulteriore restrizione, ci si limiterà all'aria fornita a ciclo aperto ovvero immagazzinata nelle bombole, escludendo i ricondizionatori di aria espirata (*rebreather*).

La descrizione fisiologica degli effetti dell'esposizione ad atmosfera iperbarica fa riferimento a quanto eccellentemente descritto da Vann e Thalmann (1993).

Una completa descrizione di tutti gli aspetti di rischio che intervengono nell'immersione può essere reperita nell'ottimo manuale d'immersione della Marina Militare Americana (facilmente reperibile in rete). Qui noi diamo un veloce elenco degli stessi al fine di chiarire i limiti d'estensione del nostro progetto.

- 1) Ipossia
- 2) Avvelenamento da CO
- 3) Ipercapnia (CO<sub>2</sub>)
- 4) Tossicità dell'ossigeno (O<sub>2</sub>)
- 5) Narcosi d'azoto (N<sub>2</sub>)
- 6) Iperventilazione
- 7) Dispnea
- 8) Enfisema
- 9) Pneumotorace
- 10) Sovradistensione gastro-intestinale
- 11) Barotrauma (orecchio, maschera, seni ossei)
- 12) Annegamento
- 13) Ipotermia o ipertermia
- 14) Embolia gassosa arteriosa
- 15) Patologia da decompressione
- 16) Osteonecrosi iperbarica
- 17) Effetti neurologici
- 18) Effetti sul DNA

Alcune di queste patologie attengono alla sfera della sicurezza più che dell'igiene del lavoro, in ragione della loro eziopatogenesi e del tempo di latenza degli effetti. Altri sono più tipicamente igienistici (punti 17 e 18). Infine ci sono alcuni elementi di un tipo che influiscono su quelli dell'altro, rendendoli di fatto non separabili nella valutazione<sup>1</sup>. Per chiarire con un esempio, non esaustivo, prendiamo in esame lo stress ossidativo. Ci sono indicazioni in bibliografia che tale stress (sia ossidativo

---

<sup>1</sup> Quando uno stesso effetto ha origine da due diverse cause e esiste una sinergia tra di esse allora si avranno due differenti relazioni causa-effetto. Per una valutazione del rischio è sufficiente prendere quel valore limite di quella delle due curve causa-effetto che impone il valore più restrittivo.

che nitrosativo) sia intrinseco alla respirazione di ossigeno iperbarico (Thom, 2009) e che a seconda della pressione della miscela respirata possa interessare i polmoni, il sistema nervoso centrale, sia entrambi (Allen *et al.* 2009). Attualmente non è stata trovata una correlazione con un danno al DNA, nel senso che il danno è stato osservato ma viene riparato entro un'ora e induce una resistenza specifica nell'individuo sano ed allenato (Groger *et al.* 2009). Resta il fatto che un fenomeno transitorio quale il rischio di tossicità dell'ossigeno si trova indissolubilmente legato con un fenomeno permanente quale il danno polmonare e con una modifica del DNA. Un altro esempio di interconnessione tra effetti a lungo e breve termine lo possiamo osservare nella formazione di microbolle nella circolazione sanguigna. Le microbolle, sia asintomatiche che sintomatiche (embolia lieve), che si formano a seguito di una decompressione (ossia il ritorno da una pressione iperbarica alla pressione normobarica della superficie del pianeta) possono indurre un'alterazione alle pareti dei vasi sanguigni (venosi) che percorrono.

Conseguentemente con la lettura della letteratura scientifica si deve argomentare che alcuni rischi hanno una origine multifattoriale (Barry *et al.* 1994; Engan *et al.* 2012; Ivkovic *et al.* 2012; Kaczerska *et al.* 2013; Pollock *et al.* 2002; Astarita *et al.* 2000; Lee *et al.* 2013) e possono avere effetti sinergici e/o antagonisti che devono essere investigati e valutati come relazione causa-effetto per poter produrre un criterio ragionato di valutazione del rischio.

### 3 - IL PROGETTO DI RICERCA

Un gruppo multidisciplinare degli ex Dipartimenti di Medicina e di Igiene del Lavoro dell'INAIL - Direzione Centrale Ricerca (attualmente riuniti nel Dipartimento di Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro ed Ambientale - DiMEILA) ha elaborato un progetto sperimentale per l'acquisizione di dati ad ampio spettro finalizzato a comprendere ed a mettere in atto la possibilità di stabilire relazioni causa-effetto tra rischio ed effetti multifattoriali dell'esposizione a pressioni iperbariche della miscela respiratoria (Martini *et al.* 2011; D'Ovidio *et al.* 2012; Martini *et al.* 2012; Marchetti *et al.* 2013; Sacco *et al.* 2013). Il nucleo di ricerca originario è stato successivamente integrato e supportato da altri nuclei afferenti a diversi centri di ricerca che si sono resi disponibili sulla base delle proprie competenze ed esigenze professionali e sperimentali.

Le finalità di questo progetto di ricerca sono indirizzate a stabilire una catena di misura che prenda in considerazione i parametri relativi ai diversi organi/tessuti/apparati che possono maggiormente essere interessati dalle condizioni che si creano nell'esposizione ad ambienti iperbarici sia in condizioni a secco che umide, sia per i lavoratori che per i subacquei amatoriali. Un'ulteriore possibilità è quella di confrontare i risultati ottenuti dalle immersioni con quelli ottenuti dalla permanenza in camera iperbarica, attraverso un approccio multidisciplinare e trasversale. E' necessario considerare, studiare e monitorare tutti i fattori personali e ambientali che possono contribuire a garantire la tutela della salute e della sicurezza dei soggetti esposti a condizioni iperbariche, al fine di mettere in atto tutte le procedure preventive, protettive e di controllo prima, durante e dopo le immersioni.

Il periodo di tempo in cui si determineranno i diversi parametri da studiare sarà compreso tra 12 ore prima e 24/48 ore dopo l'esposizione a condizione iperbarica; infatti dati di letteratura indicano che dopo 24 ore dall'immersione si può considerare conclusa la fase di decompressione. A ridosso dell'esposizione si effettueranno le valutazioni dei vari indicatori un'ora prima dell'immersione; quindi, in post-immersione, dieci minuti, un'ora e tre ore dopo. I soggetti che, su base volontaria e consenso informato, accetteranno di partecipare allo studio saranno sottoposti al protocollo che prevede la compilazione di un questionario clinico-anamnestico *ad hoc*, campionamenti su matrici biologiche (quali urine, siero, cute, etc.), nelle fasi di pre- e post-immersioni per le valutazioni dei vari indicatori. Una criticità da valutare è la distanza di tempo (un'ora o più) per effettuare i campionamenti pre-immersione ma soprattutto la distanza di tempo per i campionamenti post-immersione.

In particolare la valutazione riguarderà fattori fisici e medici rilevati in continua durante l'immersione stessa e altri di natura chimico-biologica rilevati sul campo ed analizzati in laboratorio sulle matrici biologiche:

**Il profilo d'immersione:** si rileva il profilo in termini di tempi di permanenza alle varie profondità, con la profondità stessa e con la relativa frequenza cardiaca a consumo d'aria ventilata. Questi fattori hanno diretta rilevanza sullo stress decompressivo e su tutti gli altri fattori che hanno rilevanza nell'esposizione ad alta pressione, bassa temperatura in condizione di elevata dispersione termica (elevata conducibilità termica dell'acqua) e di alterazione del metabolismo conseguente all'attività praticata.

**Lo stress nitro-ossidativo:** rilevazione ematica dello stress nitro-ossidativo e/o su campioni di urina. Si vuole correlare tale osservabile con lo stress decompressivo e, eventualmente, con altri aspetti relativi alla condizione di inquinamento chimico, microbiologico e fisiologico, oltre che con rilevazioni più veloci e meno invasive dell'ossido nitrico esalato.

**Lo stato immunologico:** i lavori in letteratura considerano importante conoscere la condizione immunologica in generale e immuno-allergologica in particolare. Le moderne tecnologie immunochimiche e molecolari offrono l'opportunità di conoscere la risposta immunologica nei confronti di un elevato numero di agenti biologici e di allergeni di origine vegetale, animale, occupazionale, alimentare.

**La composizione corporea:** la definizione dei diversi comparti corporei è molto utile ai fini della valutazione di diversi parametri biochimici tra cui elettroliti, acqua totale, acqua intra ed extracellulare, massa corporea. Inoltre è noto che una differente composizione del rapporto massa grassa/massa magra influenza la velocità di desaturazione del gas inerte e che tale influenza varia con i diversi gas inerti impiegati nelle immersioni lavorative e sportive.

**I consumi alimentari/intake/anamnesi alimentare:** la disponibilità di *software* analitici specifici consente - attraverso l'analisi di parametri specifici quali fabbisogno energetico basale, kcalocalorie, spesa energetica totale - di indicare e

rispondere ai fabbisogni alimentari/nutrizionali individuali. Tali aspetti nutrizionali sono potenzialmente legati al metabolismo differenziale in immersioni a secco e bagnate e alla capacità di mantenere l'omeotermia in immersione. Questo fattore, a sua volta, sembra avere influenza sull'insorgenza della patologia da decompressione.

**L'inquinamento (micro)biologico:** è importante monitorare tale variabile ai fini della valutazione di inquinanti biologici potenzialmente presenti nella riserva di aria compressa. Anche gli inquinanti dispersi nell'acqua possono indurre sensibilizzazione immunitaria e avere, in definitiva, un effetto sullo stato generale dell'organismo e sulla sua capacità di risposta allo stress decompressivo. Monitoraggio microbiologico ambientale: negli ambienti lavorativi indoor e outdoor (acque ad uso ricreativo, acque di balneazione, etc.) l'eventuale presenza di agenti patogeni (*Escherichia coli*, Enterococchi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Legionella spp*, *Mycobacterium spp*, *Blastomyces spp*, etc.) che possono essere responsabili di patologie infettive quali ad esempio otiti, dermatiti, infezioni cutanee, congiuntiviti, patologie respiratorie, infezioni genito-urinarie, gastroenteriti, etc..

Tali valutazioni sono finalizzate a definire degli indicatori di rischio e ad elaborare un protocollo di indagine che contribuisca alla determinazione ed allo studio dei diversi indicatori. Questi saranno correlati agli effetti a breve ed a lungo termine attraverso un confronto dei valori precedenti e successivi all'esposizione iperbarica.

Nei sommozzatori saranno valutati i seguenti osservabili:

- Il profilo d'immersione: tramite computer d'immersione Galileo SOL indossato con sonda aria e con cardiofrequenzimetro per rilevare il profilo d'immersione (tempo - profondità), l'aria ventilata e la frequenza cardiaca. La frequenza sarà correlabile con quanto rilevato con metabolimetro K5 (agefis).
- Il metabolismo individuale: con metabolimetro K5 si misura la ventilazione dell'ossigeno, dell'anidride carbonica, la ventilazione generale, la frequenza cardiaca, il costo energetico metabolico, pre e post immersione. Tale ultimo osservabile sarà monitorato, parzialmente, in immersione per mezzo del cardiofrequenzimetro indossato del computer Galileo SOL. Quindi sarà parzialmente possibile seguire la variazione di metabolismo derivante dall'immersione ed alle sue caratteristiche fisiche (pressione, temperatura, tempo) durante la curva d'immersione e di decompressione. Successivamente ci si riallacerà alle misure post-immersione fatte col K5 (agefis).
- Il carico del sistema immunitario: si propone lo studio di indicatori immunologici di suscettibilità individuale volti a valutare la risposta immunologica nei confronti di inquinamenti (micro)biologici e allergologici (vegetali, animali, occupazionali, alimentari) attraverso l'utilizzo di tecnologie immunochimiche/molecolari (agebio).
- La composizione corporea: si propone di valutare parametri biochimici specifici quali acqua totale, acqua intra ed extracellulare, massa grassa e massa magra, massa metabolicamente attiva, massa extracellulare inerte, potassio, sodio, azoto, attraverso l'utilizzo della bioimpedenziometria (agebio).

- I consumi alimentari/intake/anamnesi alimentare: si propone l'analisi di parametri biochimici specifici quali Kilocalorie, Kilojoule, fabbisogno energetico basale, spesa energetica totale, anche attraverso l'utilizzo di *software* specifici al fine di indicare e rispondere ai fabbisogni alimentari/nutrizionali individuali (agebio)
- La valutazione della qualità microbiologica dell'aria compressa (all'uscita delle bombola, dell'erogatore e del compressore di ricarica), mediante la rilevazione di specifici agenti biologici e/o loro prodotti e componenti tramite metodi colturali, biologico molecolari ed immunenzimatiche (agebio).
- La valutazione nell'aria compressa delle bombole dei principali inquinanti chimici: monossido di carbonio, anidride carbonica, etc. (agechim).

Tutto lo studio sarà condotto su soggetti lavoratori e non lavoratori aderenti su base volontaria e previo consenso informato. Le informazioni ottenute saranno trattate in forma anonima a tutela della *privacy*.

### **Soggetti**

Lo studio sarà condotto inizialmente su un gruppo ristretto di soggetti interni al gruppo di ricerca, con esperienza subacquea, al fine di mettere a punto la catena di misura e rendere le diverse misurazioni compatibili tra loro, oltre a valutare le tempistiche e il fabbisogno di supporto per una campagna di misura estesa ed intensiva.

### **Questionario**

Somministrazione di un questionario clinico-anamnestico specifico integrato di volta in volta con parti riguardanti i diversi aspetti da studiare nell'ambito del protocollo e validato per lo studio.

## **4 – PROTOCOLLO SPERIMENTALE**

I soggetti saranno preventivamente informati su alcune regole da seguire per l'esecuzione delle parti relative allo studio. Il tempo di permanenza in immersione sarà standardizzato (verosimilmente 30 minuti circa). Altrettanto per le profondità. Entrambi i parametri d'immersione saranno variati al fine di rendere più evidenti i diversi valori degli osservabili.

Tra questi, 24 ore e 1 ora prima della permanenza in camera iperbarica o in immersione saranno attuate le seguenti parti operative:

- 1) applicazione del sistema K5 per la valutazione del metabolismo individuale e dei parametri di ventilazione;
- 2) applicazione di elettrodi bioimpedenziometrici per la misurazione di parametri biochimici della composizione corporea e dello stato nutrizionale;
- 3) prelievo urinario per la determinazione di indicatori di stress ossidativo;
- 4) prelievo ematico per la determinazione di indicatori immunologici, di stress ossidativo, nitrosativo, danno al DNA, etc.

Le stesse rilevazioni verranno eseguite dopo l'immersione con un *follow up*, differente per i vari osservabili, di 24/48 ore complessive.

*Offline* rispetto alle rilevazioni sui soggetti verranno eseguite le seguenti operazioni:

- 1) Campionamento di aria delle bombole (all'uscita della bombola e all'uscita dell'erogatore) e del compressore per la rilevazione di specifici agenti biologici e/o immunologici. Valutazione della qualità microbiologica dell'aria compressa presente nelle bombole di rifornimento dei subacquei, in accordo con le indicazioni riportate nelle norme tecniche ISO 8573-7:2003 e ISO 8573-1:2010 (agebio).
- 2) Valutazione funzionale-diagnostica del subacqueo (CIR).
- 3) Valutazione della curva d'immersione sulla base delle principali teorie presenti in bibliografia (agefis).
- 4) Valutazione dello stato immuno/allergologico dei soggetti: indagine immunoenzimatica e/o molecolare di reattività a specifici agenti su campioni ematici attraverso indagine di specifici allergeni (vegetali, animali, occupazionali, alimentari) con metodologie immunochimiche/molecolari (agebio).
- 5) Valutazione dei compartimenti corporei/composizione corporea: indagine bioimpedenziometrica per la valutazione dello stato di idratazione, della massa magra e grassa; del peso desiderabile; delle componenti metaboliche; dello stato elettrolitico; delle componenti minerali. In particolare possono essere valutati i parametri fisiologici e biochimici (agebio).
- 6) Valutazione della qualità microbiologica dell'aria compressa presente nelle bombole di rifornimento dei subacquei, in accordo con le indicazioni riportate nelle norme tecniche ISO 8573-7:2003 e ISO 8573-1:2010 (agebio).
- 7) Valutazione dei consumi alimentari/intake/anamnesi alimentare: analisi di parametri fisiologici e biochimici specifici quali Kilocalorie, Kilojoule, fabbisogno energetico basale, spesa energetica totale, anche attraverso l'utilizzo di *software* e moduli applicativi specifici al fine di indicare e rispondere ai fabbisogni alimentari/nutrizionali individuali. Possibilità di rilevare l'abitudine e il consumo alimentare, di attuare programmi educazionali e di prevenzione. (agebio).
- 8) Valutazione dello stress ossidativo nei sistemi biologici con la misura di biomarcatori che riflettono il danno indotto da un attacco da parte delle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto e, in particolare, dai ROS e RNS: 8-oxoGua, 8-oxodGuo, e 8-oxoGuo, risultanti dall'ossidazione della guanina nel DNA e nell'RNA (quali indicatori di effetto), isoprostani, prodotti di perossidazione lipidica, determinabili sia nelle urine come marcatori di stress ossidativo che nel condensato dell'espirsto come *markers* di infiammazione. Tutti questi biomarcatori verranno determinati nelle urine mediante HPLC-MS/MS (monitbio, Tor Vergata).
- 9) Valutazione metabolica con metabolometro K5 a secco; valutazione del ritmo cardiaco in immersione con cardiofrequenzimetro subacqueo e successiva (*off line*) derivazione del metabolismo con adattamento in temperatura; ripetizione della valutazione con K5 dopo l'immersione ed in *follow up* per due ore (agefis).
- 10) Sulla frazione plasmatica saranno misurati (Tor Vergata):

- a) nitriti e nitrati attraverso il metodo spettrofotometrico al reattivo di Griess, quale valutazione indiretta di ossido nitrico (NO);
  - b) i livelli di proteine carbonilate (ossidate sui carboni  $\alpha$  della catena polipeptidica) mediante tecniche immuno-elettroforetiche (Western blot) previa reazione dei gruppi chetonici e aldeidici con dinitrofenilidrazina (DNP) e successivo riconoscimento con anticorpo anti-DNP;
  - c) i livelli di proteine nitrosilate mediante biotin switch assay e riconoscimento in chemiluminescenza con streptavidina coniugata alla perossidasi di rafano (HRP). Alternativamente si utilizzeranno anticorpi anti nitroso-cisteina (SNO);
  - d) i livelli di nitrotirosine proteiche mediante tecniche immuno-elettroforetiche (Western blot) con anticorpo anti-nitrotirosine;
  - e) i livelli dei tioli circolanti, cisteina, cistina, glutatione ridotto (GSH), ossidato a disolfuro intramolecolare (GSSG) e misto a proteine (GS-prot) e nitrosilato (GSNO) mediante tecniche di cromatografia liquida ad elevata efficienza (HPLC) previa riduzione del campione con boroidruro di potassio (KBH<sub>4</sub>) o, alternativamente, ascorbato;
- 11) Sulla frazione leucocitaria saranno misurati (Tor Vergata):
- a) nitriti e nitrati;
  - b) i livelli di proteine carbonilate;
  - c) i livelli di proteine nitrosilate;
  - d) i livelli di nitrotirosine proteiche;
  - e) i livelli dei tioli intracellulari come precedentemente indicato al punto 7.
- 12) In aggiunta a questo pannello di analisi, se le quantità del campione lo permetteranno, saranno dosati (Tor Vergata):
- a) il numero di leucociti totali per ml;
  - b) i livelli degli enzimi che sintetizzano l'NO (NO sintasi, NOS), in particolare la forma inducibile (iNOS) ed endoteliale (eNOS), mediante tecniche immuno-elettroforetiche (Western blot) con anticorpi specifici. Verranno inoltre dosati i livelli di RNA messaggero mediante e real time PCR (o PCR quantitativa);
  - c) i livelli di enzimi antiossidanti superossido dismutasi (SOD), catalasi e glutatione perossidasi (GPx) mediante tecniche immuno-elettroforetiche (Western blot) con anticorpi specifici e analisi dell'attività enzimatica in spettrofotometria. Verranno inoltre dosati i livelli di RNA messaggero mediante e real time PCR (o PCR quantitativa);
  - d) i livelli relativi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mediante tecniche citofluorimetriche previa incubazione con diclorofluoresceina (utilizzata per misurare il perossido di idrogeno) e la diidroetidina (utilizzata per misurare lo ione superossido);
  - e) i livelli di NO libero mediante tecniche citofluorimetriche previa incubazione con diamino fluoresceina;
  - f) i livelli di S-nitrosoglutatione reduttasi (GSNOR) mediante tecniche immuno-elettroforetiche (Western blot) con anticorpi specifici, e analisi dell'attività enzimatica in spettrofotometria. Verranno inoltre dosati i livelli di RNA messaggero mediante e real time PCR (o PCR quantitativa);

- g) i livelli di danno alla doppia elica del DNA mediante tecniche immunoelettroforetiche (Western blot) e/o di immunofluorescenza e successiva visualizzazione in microscopia previa fissazione dei leucociti con paraformaldeide e incubazione con anticorpo che riconosce la forma fosforilata (attiva) dell'istone H2A.X;
  - h) i livelli di morte cellulare per apoptosi mediante tecniche citofluorimetriche, o necrosi mediante colorazione previa esclusione da Trypan blue.
- 13) Sulla frazione eritrocitaria saranno dosati (Tor Vergata):
- a) i livelli totali di glutatione tramite HPLC;
  - b) i livelli di emoglobina nitrosilata mediante il metodo spettrofotometrico al reattivo di Griess accoppiato a riduzione con cloruro di mercurio (HgCl<sub>2</sub>);
  - c) il rapporto emoglobina/metaemoglobina con analisi spettrofotometriche.

#### ***Analisi statistica***

I risultati ottenuti saranno inseriti in un *data-base* di un programma statistico di gestione e analisi dati quali SPSS (*Statistical Package for Social Science*). Sarà messo a punto un modello statistico che, partendo dall'inserimento dei dati, sia in grado di valutare e rilevare le significatività dei diversi parametri biochimici e fisiologici messi a confronto, attraverso l'utilizzo di *test* e analisi idonei. I software impiegati per tale elaborazione saranno: R, PSPP, Excel®.

L'elaborazione dei dati sarà presentata in forma descrittiva, numerica e grafica. Quanto di rilievo ai fini della valutazione dei rischi verrà inserito nel Portale Agenti Fisici (PAF).

## **5 - STATO DI ATTUAZIONE**

Il progetto ha richiesto un tempo notevole per essere approvato e per diventare operativo. Infatti il Piano d'Attività della Ricerca (PAR) triennale INAIL è stato approvato ad agosto del 2014. Questo ha consentito di effettuare gli ordini, che stanno arrivando a consegna.

Le convenzioni con i laboratori esterni sono diventate operative con la consegna dei materiali di consumo di laboratorio. Quindi si è proceduto alla ricerca delle componenti sperimentali che parteciperanno in qualità di soggetti volontarie alle ricerche. Per mettere a punto la catena di misura, che si presenta complessa e molto articolata, si farà uso di volontariato interno al DiMEILA, mentre per le fasi di raccolta dati ci si avvarrà di volontari scelti tra gruppi omogenei di subacquei professionisti di settori economici ben definiti (Protezione Civile, Vigili del Fuoco, Istruttori subacquei, Guide Subacquee, etc.).

La prima parte del progetto, consistente nella somministrazione di questionari, si può svolgere a prescindere dall'attività in camera iperbarica ed in acqua ed già stata avviata. Sono in fase di somministrazione dei questionari clinico-anamnestici specifici, integrati di volta in volta con parti riguardanti i diversi aspetti da studiare nell'ambito del protocollo, diversificati per i gruppi omogenei dei subacquei e validati. È necessario, ai fini della comprensione delle caratteristiche di ciascun gruppo omogeneo, somministrare e far compilare ai sommozzatori lavoratori e

amatoriali (in ambiente secco e umido) che prenderanno parte allo studio un questionario per conoscere anamnesi, abitudini di vita, lavorative, informazioni legate alla pratica subacquea. A seguito della raccolta di questi dati si procederà alla loro elaborazione statistica e anamnestica.

La primavera inoltrata porterà ai primi test sul campo, sia in camera iperbarica che in acqua. Di seguito si metterà a punto il protocollo, organizzandolo con quanto praticamente fattibile.

## 6 - CONCLUSIONI

Il progetto è avviato alla sua fase esecutiva, anche se mancano alcune messe a punto che verranno eseguite in itinere. Questo non vuol dire che sia vincolante. Anzi è, e sarà, sempre possibile aggiungere ulteriori misure. Pertanto chiunque voglia collaborare è invitato a avanzare le sue proposte allo scrivente.

Tutto quanto messo a punto nel corso del presente progetto, ed i relativi risultati sperimentali, che avranno una qualche valenza ai fini della valutazione del rischio iperbarico, saranno inseriti sul sito del PAF: [www.portaleagentifisici.it](http://www.portaleagentifisici.it)

### Ringraziamenti

Si ringraziano per la loro preziosa e cordiale collaborazione la Dott.ssa Giuliana Valente ed il Dott. Corrado Costanzo.

## 7 - BIBLIOGRAFIA

1. Allen BW, Demchenko IT, Piantadosi CA. Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanism of oxygen toxicity. *J. Appl. Physiol.* 2009; 106:662-667.
2. Astarita C, Gargano D, Di Martino P. Pollen trapped in a scuba tank: a potential hazard for allergic divers. *Ann Intern Med.* 2000 Jan 18;132(2):166-167.
3. Barry MK, Aloisi JD, Pickering SP, Yeo CJ. Nitric oxide modulates water and electrolyte transport in the ileum. *Ann Surg.* 1994 Apr;219(4):382-388.
4. D'Ovidio MC, Sbardella D, Bertini L, Capanna S, Corso L, Spalletta M, Martini A. Valutazione dell'ossido nitrico (FeNO) in operatori subacquei vigili del fuoco nella pre- e post-immersione: risultati preliminari. *G Ital Med Lav Erg.* 2012; 34(3) Suppl 2: 172-173.
5. Engan HK, Jones AM, Ehrenberg F, Schagatay E. Acute dietary nitrate supplementation improves dry static apnea performance. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012 Jul 1;182(2-3):53-59.
6. Groger M, Oter S, Simkova W, Bolten M, Koch A, Warninghoff V, Georgieff M, Muth CM, Speit G, Radermacher P. DNA damage after long-term repetitive hyperbaric oxygen exposure. *J. Appl. Physiol.* 2009;106:311-315.
7. Ivkovic D, Markovic M, Todorovic BS, Balestra C, Marroni A, Zarkovic M. Effect of a single pool dive on pulmonary function in asthmatic and non-asthmatic divers. *Diving Hyperb Med.* 2012 Jun;42(2):72-77. Erratum in: *Diving Hyperb Med.* 2012 Dec;42(4):236.

8. Kaczerska D, Siermontowski P, Olszański R, Krefft K, Małgorzewicz S, Van Damme-Ostapowicz K. The influence of high-fat diets on the occurrence of decompression stress after air dives. *Undersea Hyperb Med.* 2013 Nov-Dec;40(6):487-97.
9. Lee YI, Ye BJ. Underwater and hyperbaric medicine as a branch of occupational and environmental medicine. *Ann Occup Environ Med.* 2013 Dec 19;25(1):39.
10. Marchetti MR, D'Ovidio MC, Ghiselli A, Baccolo TP. Progetto per la valutazione dei rischi correlati all'alimentazione dei lavoratori. *G Ital Med Lav Erg.* 2013; 35(4) Suppl:170.
11. Martini A, Sbardella D, Bertini L, Capanna S, Spalletta M, D'Ovidio MC. Studio dell'infiammazione delle vie aeree in vigili del fuoco operatori subacquei. *G Ital Med Lav Erg.* 2011;33(3), Suppl 2:328-329.
12. Martini A, Sbardella D, Bertini L, Capanna S, Spalletta M, D'Ovidio MC. Airway inflammation in professional divers: FeNO as a marker. *Undersea Hyperb Med.* 2012; 39(5):901-907.
13. Pollock NW, Harris MF. Effect of daily exposure to compressed air on immune response. *Undersea Hyperb Med.* 2002; 29(2): 129-130.
14. Sacco F, Corso L, D'Amico W, D'Ovidio MC, Martini A, Tirabasso A, Marchetti E. Linee di sviluppo per una valutazione integrata del rischio iperbarico. *G Ital Med Lav Erg.* 2013; 35(4):177.
15. Thom S. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J. Appl. Physiol.* 2009;106:988-995.
16. Vann RD, Thalmann E D. Decompression physiology and practice, in Bennett P and Elliott D, "The physiology and medicine of diving", 1993, 4<sup>th</sup> ed., Saunders, 376-432.