

Appunti dr. Pasquale Longobardi

“Medicina subacquea: Work in progress”. Grosseto, 21.09.2011

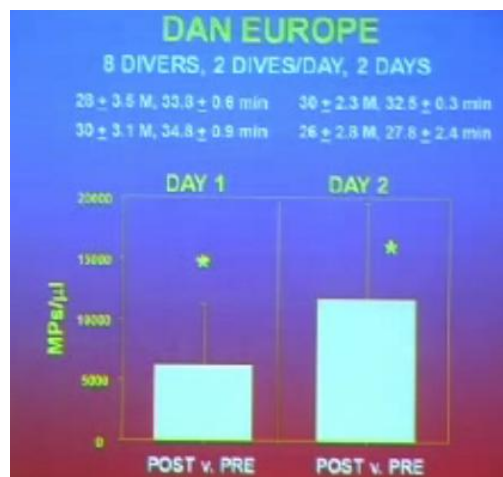
Stephen Thom “Microparticles and Decompression Illness: updating the lane of research (Microparticelle e incidente da decompressione: aggiornamenti sul percorso di ricerca)”

Lo studio sul ruolo delle microparticelle (MP) nella patogenesi dell'incidente da decompressione (DCI) è stato sponsorizzato dalla US Navy.

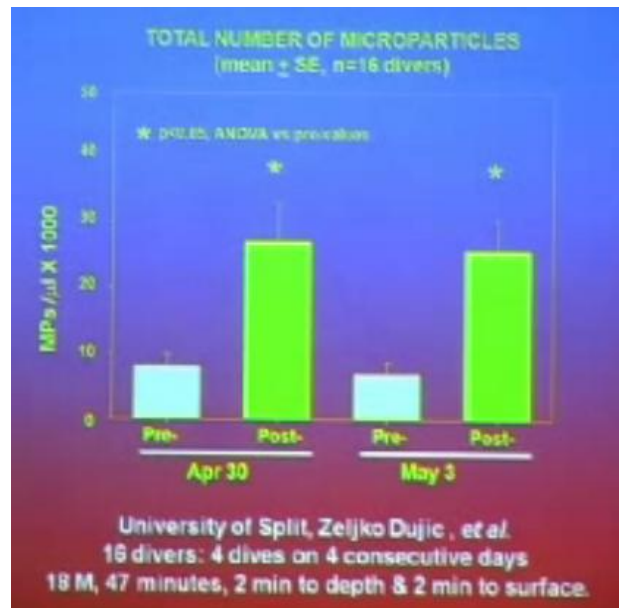
L'incidente da decompressione è oggi ritenuta una patologia prevalentemente infiammatoria (l'ipotesi prevalente nel passato era quella ischemica: la bolla o il trombo di piastrine che bloccano il vaso sanguigno). La morte delle cellule, l'apoptosi, lo stress ossidativo, l'attivazione tramite calcio determinano che molte cellule (endotelio, piastrine, ecc.) emettano le microparticelle che sono delle vescicole contenenti proteine (mediatori) capaci di attivare la risposta immunitaria. Nel sangue normalmente ci sono duemila microparticelle per millilitro di sangue, ciascuna delle dimensioni di 0,1-1 micron. In molte patologie (sclerosi multipla, malattie reumatiche, tumori, ecc.) il numero di microparticelle aumenta in maniera significativa. Non è importante solo la quantità e dimensione delle MP ma anche quali particelle siano contenute in esse.

L'Autore ha analizzato due studi (DAN e Università di Split) che rilevano le MP in subacquei che si sono immersi respirando aria e uno studio relativo a un subacqueo tecnico.

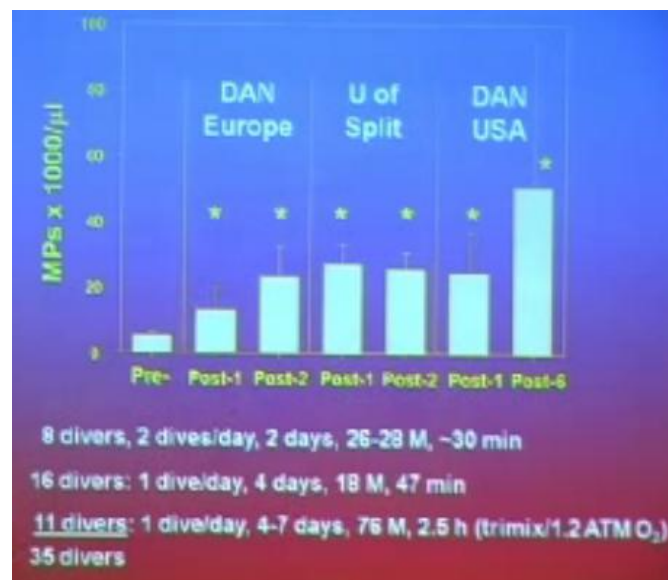
Lo studio DAN è stato eseguito su otto subacquei che hanno effettuato immersioni ripetitive (due al giorno per due giorni) a 26-30 metri x circa 30 minuti. E' stato rilevato un aumento delle micro particelle, particolarmente dopo la seconda immersione del secondo giorno (figura 1)



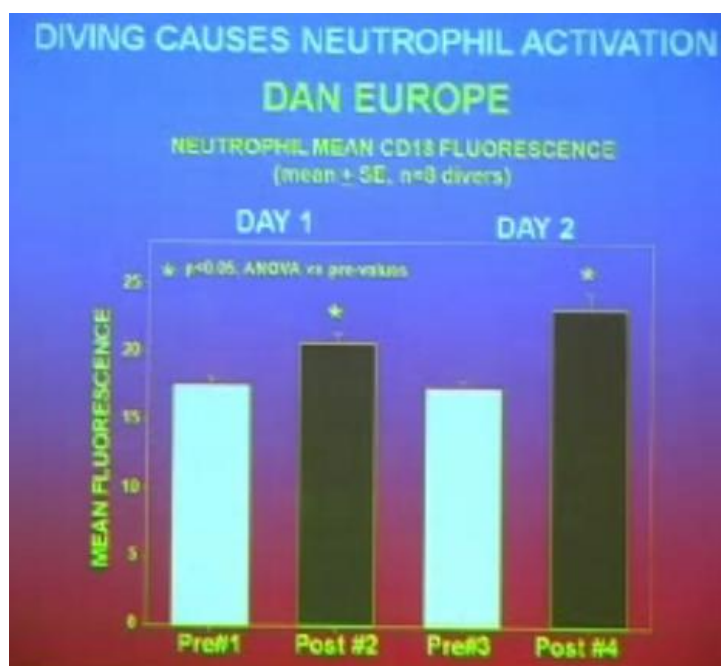
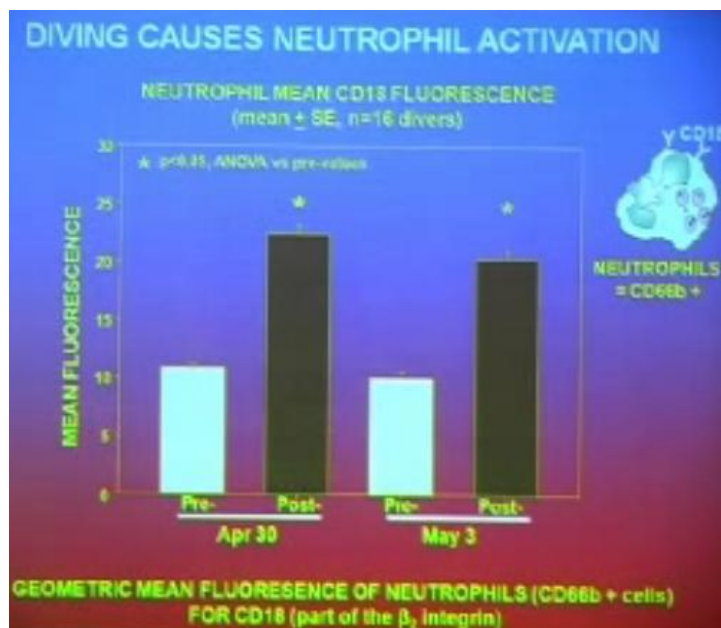
Lo studio dell'Università di Split (16 subacquei, immersione ripetitiva x due giorni a 18 metri x 47 minuti, tempo di discesa e risalita: due minuti) evidenziava lo stesso risultato (figura 2)



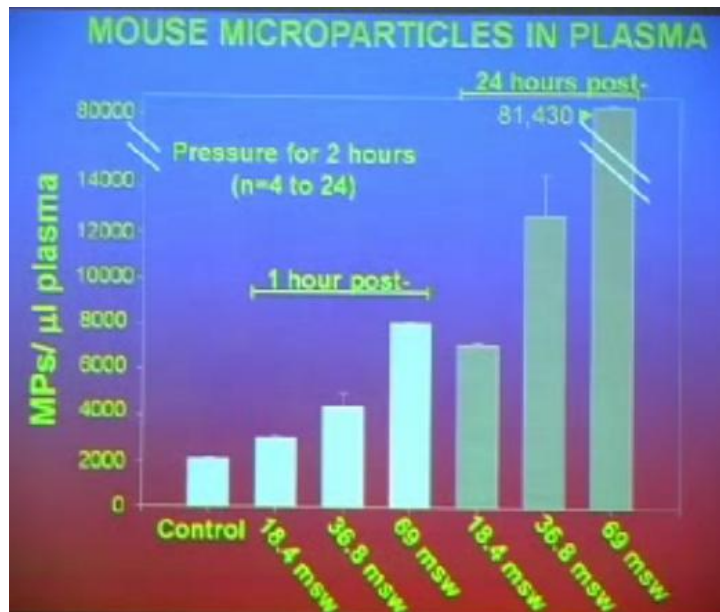
Confronto tra i due precedenti studi e il terzo del DAN USA basato su undici subacquei che hanno effettuato immersione tecnica con autorespiratore a riciclo chiuso (ARR-C) a 76 metri per 2,5 ore per 4-7 giorni (ppO₂ di 1,2). In totale sono stati studiati trentacinque subacquei (figura 3)



L'immersione determina attivazione dei leucociti (espressione del CD18 che è una parte delle B2 integrine) attraverso l'aumento delle microparticelle che si è visto essere correlato con la decompressione (figura 4 - 5)



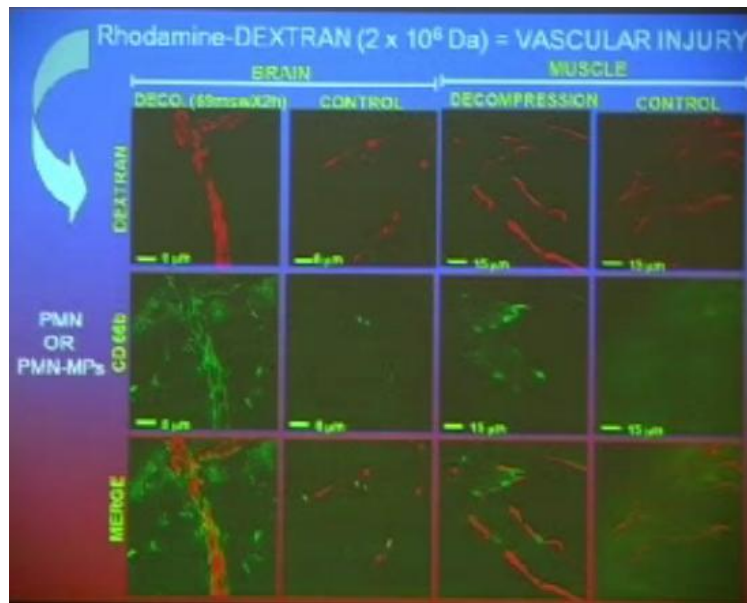
L'aumento delle microparticelle è correlato con lo stress decompressivo (maggiore quando l'immersione sia profonda, ripetitiva, ecc.). Nel grafico successivo si nota un significativo aumento delle MP dopo un'ora e dopo 24 ore dalla emersione. Dopo 24 ore dalla da immersione a 69 metri vi sono 81.430 microparticelle (fig. 6).



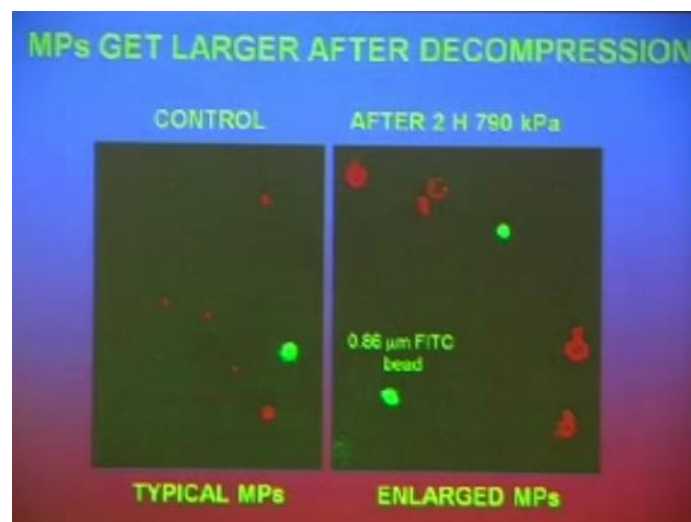
Il meccanismo del danno infiammatorio è il seguente: le MP attivano i neutrofili (PMN); questi aderiscono all'endotelio; avviene la diapedesi nei tessuti. Se si eliminassero le micro particelle non vi sarebbe la reazione infiammatoria (fig. 7).

1. PMN ACTIVATION OCCURS DUE TO MP_s INTERACTIONS
 2. PMN ATTACH TO TISSUE VASCULATURE
 3. VASCULAR LEAK OCCURS
 4. IF NO MP_s, NO INJURY
- Thom, et al. J Appl Physiol 110: 340, 2011

La colorazione con rodamina-destrano evidenzia la diapedesi dei neutrofili nei ratti sottoposti a decompressione (fig. 8).

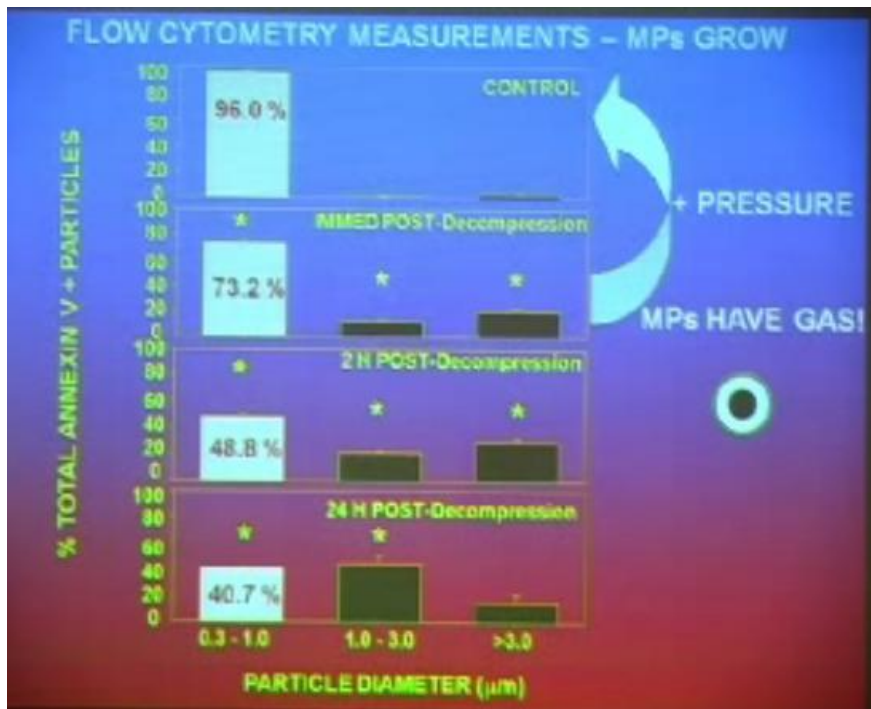


Dopo la decompressione le micro particelle (già presenti prima dell'immersione) diventano più grandi. Nella figura successiva sono riportate le MP prima e dopo l'immersione (nell'immagine dopo 2 ore da immersione a 69 metri) – fig. 9.

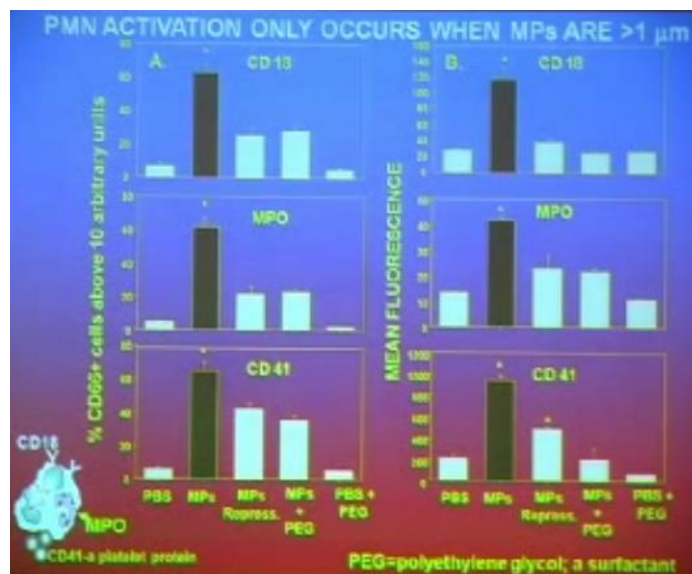


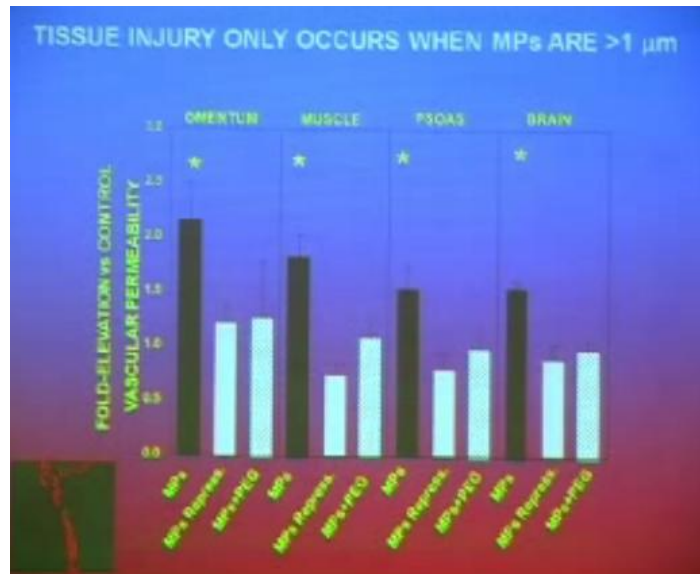
Dopo la decompressione si modifica la curva di distribuzione delle micro particelle (suddivisione in gruppi basata sulla grandezza). Si ipotizza che nelle MP vi sia del gas perché la loro dimensione si riduce ai valori iniziali quando esse siano ricomprese. Dopo 24 ore si riducono le dimensioni delle MP > 3 micron.

Corrado Costanzo chiede se ci sia correlazione tra MP > 3 micron e danno neurologico. Thom raccomanda di essere prudenti nel correlare i risultati della ricerca direttamente con la clinica. Non è importante solo la dimensione delle MP ma anche le proteine (mediatori) contenute nelle MP e la loro capacità di interazione con il sistema immunitario (fig. 10).

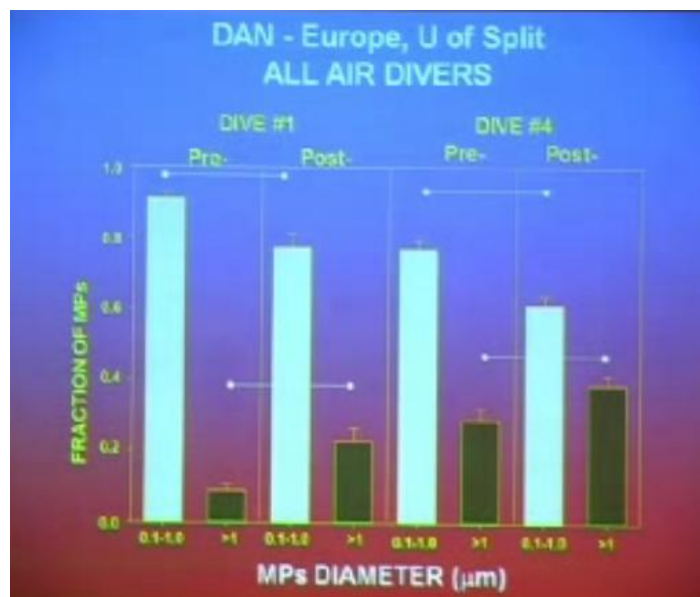


L'attivazione dei neutrofilii avviene solo se le MP siano più grandi di un micron. L'infiammazione determina un importante stravasamento di fluidi nei tessuti (fig. 11-12).

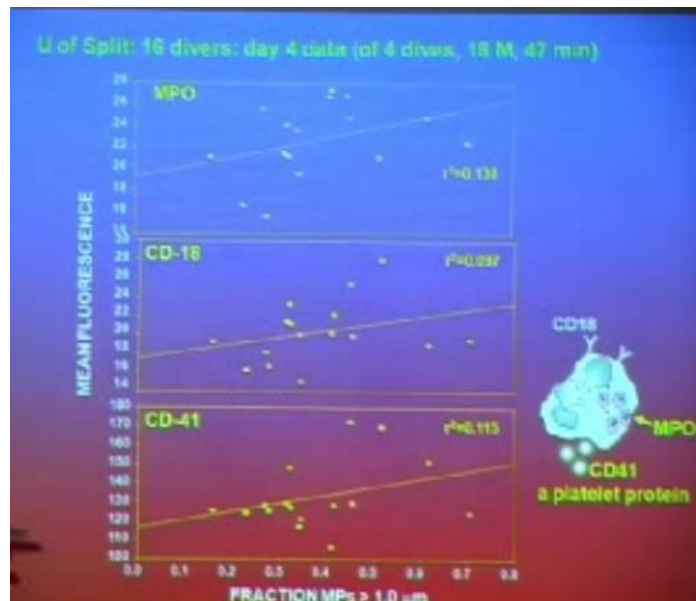




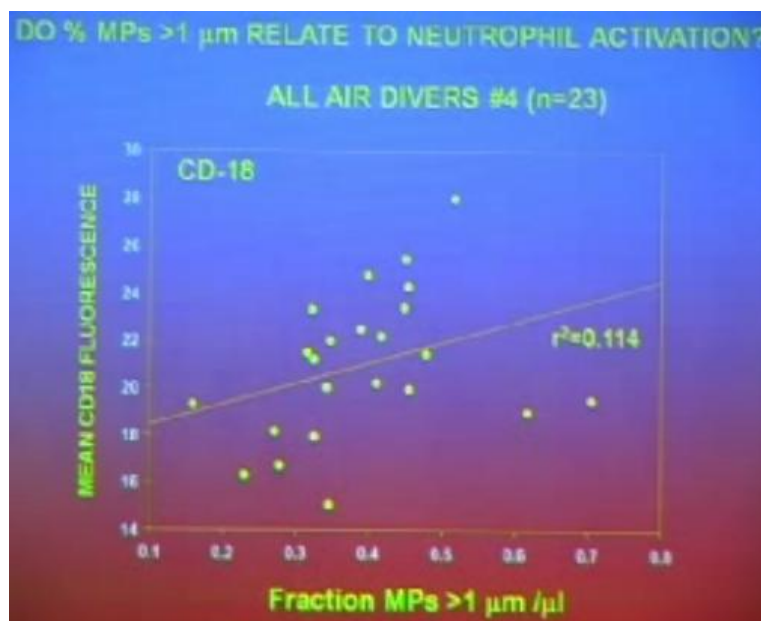
Confronto tra lo studio DAN Europe e quello della Università di Split su subacquei che si sono immersi in aria. Con l'aumento dello stress decompressivo cambia la distribuzione delle MP, aumentano le MP > 3 micron (vedi la seconda immersione del secondo giorno rispetto alla prima del primo giorno) – fig. 13.



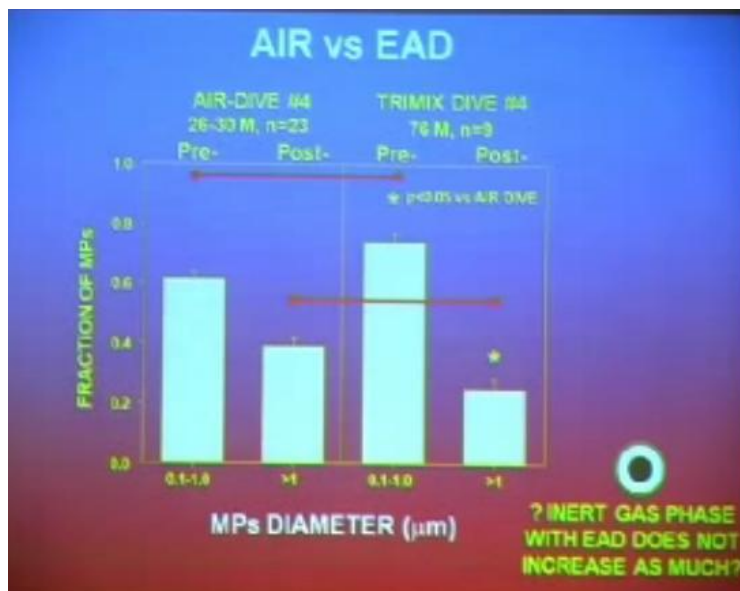
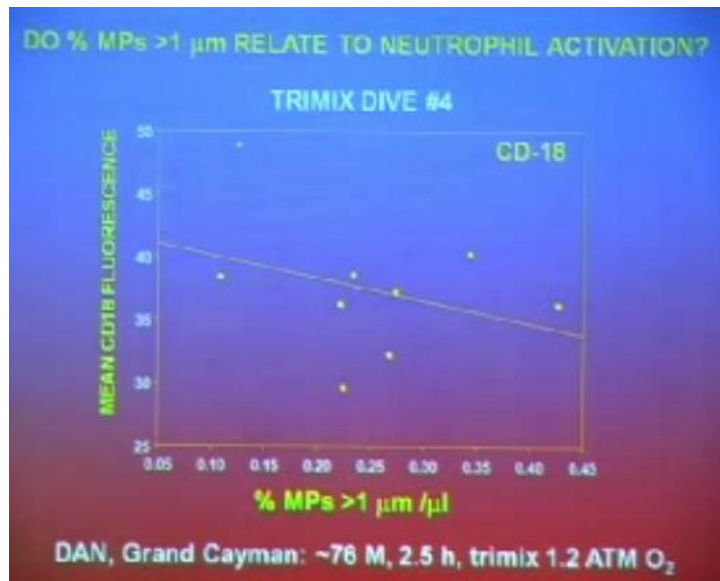
L'innescò delle MP in correlazione con la decompressione è dimostrato attraverso la valutazione di diversi marcatori dei neutrofili (MPO, CD18, CD41) – fig. 14.



Aumento delle particelle CD-18 (parte delle $\beta 2$ integrine) in tutti i 24 subacquei che si sono immersi respirando aria (fig.15).



Invece nei subacquei tecnici (respirazione in trimix, ppO_2 1,2) dopo l'immersione la quantità di CD-18 si riduce (nota: il campione è piccolo) – fig. 16-17.



Prime conclusioni: le bolle interagiscono con le cellule del sangue; si ha una apertura dei canali del calcio e iperpolarizzazione delle membrane; si ha la produzione delle micro particelle (MP). Le MP aumentano di dimensione dopo le immersioni (sia nel topo che nell'uomo); c'è correlazione tra la quantità di MP e lo stress decompressivo (sicuro nel topo, da verificare nell'uomo); le MP (specialmente quelle che derivano dalla piastrine) si legano ai neutrofili e li attivano (sicuro nel topo, da verificare nell'uomo); vi è diapedesi dei neutrofili attraverso la parete dei vasi sanguigni e danno infiammatorio nei tessuti.

Commenti: finora si tratta di studi su solo 35 subacquei che si sono immersi con profilo di immersione quadro. Costanzo chiede se ci siano studi su immersioni multilivello: risposta negativa (è da valutare). I subacquei tecnici si

sono immersi con profilo multilivello ma sono pochi per trarre conclusioni valide (fig. 18-19).

1. MICROPARTICLES INCREASE POST-DIVE (MICE & MAN)
2. MORE PROVOCATIVE DIVING YIELDS MORE MPs (MICE, ?MAN)
3. MPs (ESP. FROM PLATELETS) LINK TO PMN & CAUSE ACTIVATION (MICE, ? MAN)

- CONCLUSIONS & WHAT IS NEXT?
1. Bubbles interact with vascular cells
 2. (Ca⁺⁺) channels cause hyperpolarization
 3. MPs are generated (platelet and PMN-MPs particularly injurious).
 4. MPs enlarge due to gas super-saturation.
 5. LARGE MPs interact/activate with PMN.
 6. PMN adhere to vasculature
 7. Local injury - progressive MPs production
 - more PMN activation/attachment.
 - more injury
- A. Bubble-related events (such as MPs) mediate progressive vascular damage & symptoms of DCS
B. All results consistent with hypothesis: DCS is an inflammatory disease !
- MORE DIVERS, MORE ANIMAL STUDIES

F. Faralli "L'immersione tecnica e il rischio decompressivo"

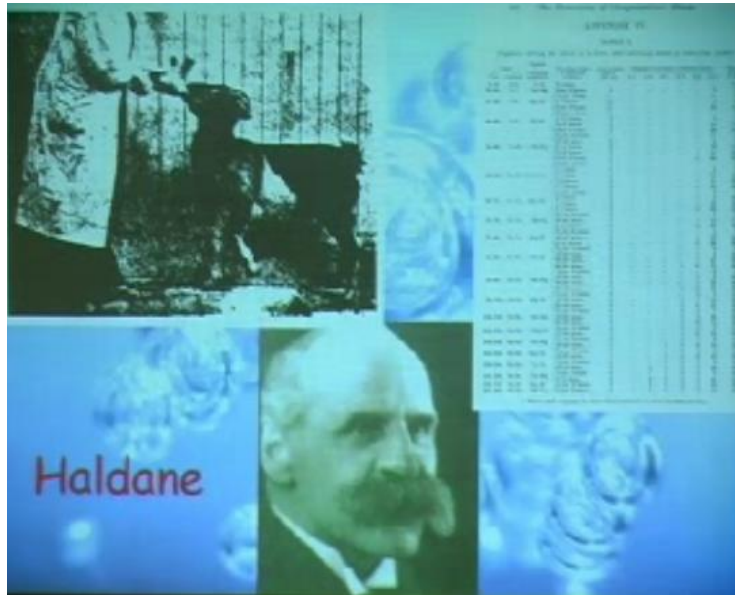
Paul Bert introdusse il concetto della bolla come responsabile dell'incidente da decompressione (fig. 1).



Furono i tedeschi Heller, Mager e von Shrotter a elaborare la formula per il calcolo della decompressione (figura 2)

The slide is titled 'Heller-Mager-von Shrotter' and features a mathematical formula for decompression:
$$P_t = P_0 + (P_i - P_0)(1 - e^{-kt})$$
 The background of the slide shows several bubbles of varying sizes.

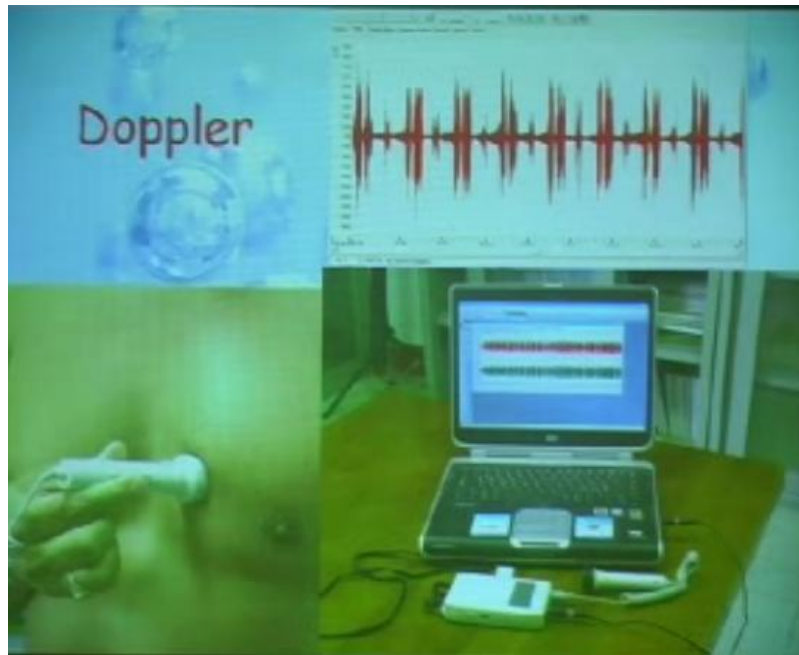
La formula fu utilizzata da Haldane che eseguì la sperimentazione lavorando con le capre, animale da esperimento con caratteristiche fisiologiche simili all'uomo. Il suo modello era deterministico: se fossero rispettate le ipotesi imposte dal modello (non permettere, durante la risalita, il raddoppio del gas inerte disciolto nel compartimento in esame rispetto alla pressione ambiente) non vi dovrebbe essere la formazione delle bolle (fig. 3).



Buhlmann è conosciuto perché è stato il primo a divulgare i modelli decompressivi che prima erano segreti in ambito militare (fig. 4).



Questi modelli non prevedevano l'innescò di bolle, qualora le indicazioni di compressive delle tabelle siano rispettate. La rilevazione doppler ha evidenziato che ciò non è corretto (fig. 5).



Sono, quindi, nati nuovi approcci: termodinamico (Hills), VVal-18 (Thalman); probabilistico (Thalman, Weathersby); Deep Stops (Pyle); VPM-RGBM (Yount, Wienke); WKPP (Irvine, Jablovsky) (fig. 6).



Le nuove tabelle US Navy sono basate sul modello VVal-18 (Thalman) che considera sia il gas disciolto che quello in fase libera (bolle). Finalmente nei modelli di calcolo della decompressione è stato introdotto il concetto della bolla.

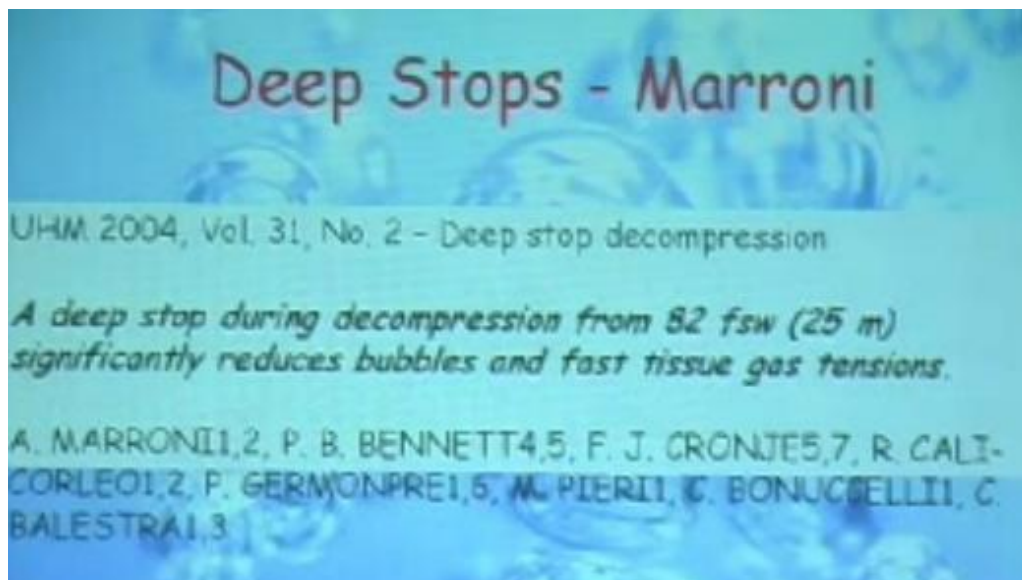
I modelli più utilizzati dai subacquei tecnici sono le Deep Stops di Pyle; i modelli a microbolle: VPM, RGBM; le procedure del WKPP (Irvine-Jablovsky). Questi modelli introducono soste più profonde dei modelli compartimentali. Nel VPM, RGBM le soste sono calcolate dal modello (software); nel metodo Pyle le soste sono introdotte "di forza" sulla base di un calcolo matematico. Pyle

raccomanda di calcolare il profilo di decompressione con un qualsiasi modello (lui faceva riferimento ai modelli compartimentali); aggiungere una sosta alla profondità che sia la metà tra la profondità massima e la prima sosta calcolata dal software; ricalcolare il profilo (questo passaggio è spesso omesso dai subacquei); proseguire con questo sistema fino a quando la profondità tra la sosta profonda e la successiva (più superficiale) non sia inferiore ai nove metri.

Yount, elaborando il Tiny Bubble Group Varying Permeability Model, ipotizzò che i micronuclei siano impermeabili ai gas quando pressurizzati oltre le otto ATA.

Winkle, con il Reduced Bubble Gradient Model (RGBM), proseguì gli studi per le immersioni ripetitive e vide che la pressurizzazione ripetitiva riduce i micronuclei. Se si sospendono le immersioni ripetitive, il patrimonio iniziale di micronuclei si riforma in ventuno (ventotto?) giorni. Il prof. Zannini aveva segnalato – molto tempo fa - che esposizioni ripetute a oltre 5 ATA riducevano i micronuclei; riteneva che, dopo sospensione delle immersioni, il patrimonio di micronuclei si riforma in 4-5 settimane.

Marroni ha segnalato (2004) i primi studi sull'efficacia delle soste profonde nel ridurre l'innesco delle bolle e la tensione del gas inerte nei compartimenti rapidi (5-10 minuti) – figura 7/8.



Deep Stops - Marroni

Table 3 - Fast tissue saturation and bubble scores after the different dive profiles

Ascend Rate	Stops	Average surfacing saturation (%) 5 min Tissue	Average surfacing saturation (%) 10 min Tissue	BSI (ESS-SS)	Total Time to Surface minutes
3 m/min (Profile 2)	No Stop	48	75	8.78 / 8.97	8
3 m/min (Profile 5)	6 m / 5 min	53	60	8.10 / 10.04	13
3 m/min (Profile 8)	15 + 6 m / 5 min	22	49	3.50 / 4.33	18
10 m/min (Profile 1)	No Stop	61	82	7.51 / 8.48	2.5
10 m/min (Profile 4)	6 m / 5 min	43	65	5.39 / 7.37	7.5
10 m/min (Profile 6)	15 + 6 m / 5 min	25	52	1.79 / 2.30	12.5
18 m/min (Profile 3)	6 m / 5 min	47	68	7.41 / 8.78	8.5
18 m/min (Profile 7)	15 + 6 m / 5 min	28	55	3.25 / 4.64	11.5

Nel 2007 Marroni e al. hanno pubblicato uno studio che segnalano come tempo ottimale per le soste profonde 2,5 minuti (figura 9).

Deep Stops - Marroni

We conclude that 2.5 min at 15 msw (50 fsw) is the optimal deep stop time following 25 msw (82 fsw) dives for 20 to 25 min for preventing PDDB (precordial Doppler detectable bubbles). Shorter or longer times are not as effective. The shallow stop at 6 msw (20 fsw) for 3-5 mins normally recommended does not seem as important. However, longer times do not afford additional benefit in reducing PDDB.

Autori francesi hanno segnalato che, invece, l'introduzione di soste profonde nella decompressione da immersioni profonde e con breve permanenza sul fondo comporta un aumento della probabilità di incidente da decompressione (figura 10 - 11).

Deep Stops - Blatteau

Blatteau J-É, Hugon M, Gardette B, Sainy J-M, Galland F-M.

Bubble incidence after staged decompression from 50 or 60 msw: effect of adding deep stops.

Aviat Space Environ Med 2005; 76:490-492.

Deep Stops - Blatteau

Three experimental profiles (EAP) with "deep stops" compared to standard profiles (MN90) (N=8)

I: 60 msw/20 min

II: Repet. dives 50 msw/15 min

III: 60 msw/15 min

EAPs produced equally or more VGE than the MN90, one case of DCI (vs. nil) and one case of humerus necrosis

Gerth ha addirittura sospeso lo studio sperimentale per i numerosi casi di incidente da decompressione che si sono verificati dopo l'introduzione di una sosta profonda a 21 metri in una procedura di decompressione calcolata con modello VVal 18 per una immersione alla profondità di 52 metri (che prevedeva una prima tappa alla profondità di 12 metri) – figura 12-13.

Deep Stops - Gerth

Gerth WA, Gault KA, Doolette DJ.

Empirical Evaluation of the Efficacy of Deep Stops in Air Decompression Dives.

Undersea Hyperb Med 2007;34(4):231-2.

Deep Stops - Gerth

Experimental dives to 52 msw with conventional (VVAL18) "shallow stop" or gas phase (BVM) "deep stop" model (initial stop at 21 resp 12 msw)

Trial terminated after midpoint interim analysis due to higher DCI incidence in "deep stop" procedure (11/198 vs. 3/190, $p < 0.05$)

Brubakk ha verificato che l'aumentata probabilità dell'incidente da decompressione è correlato con l'introduzione di soste profonde durante la decompressione da immersioni profonde e di breve durata. Invece le soste profonde riducono la probabilità di incidente da decompressione qualora siano introdotte in decompressione da immersioni meno profonde e di lunga durata (figura 14-15-16).

Deep Stops - Brubakk

Gutvik, CR; Møllerløkken, A; Brubakk, AO

Difference in bubble formation using deep stops is dependent on length of bottom time; experimental findings and theoretical support

Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc. Annual Scientific Meeting held June 14-16, 2007.
Ritz-Carlton Kapalua Maui, Hawaii

Deep Stops - Brubakk

The long/shallow dive achieved a significant decrease of vascular bubbles following the procedure with deeper initial stops (Copernicus schedule) compared to the controls (Bühlmann schedule). However, on the deep/short dive the procedure with deeper stops gave a dramatic increase of bubble formation, resulting in the protocol to be aborted after two trials.

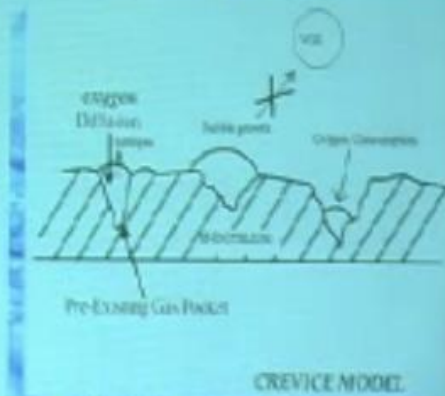
Deep Stops - Brubakk

A new stabilizing mechanism for bubble nuclei had to be developed in order to simulate and reproduce the findings in this study. "Traditional" bubble models will in general suggest that adding some deep stops is beneficial for decompression outcome, however this may not always be true. The presented studies suggest that deep stops are not recommended on shorter dives.

Faralli ricorda i meccanismi di formazione delle bolle: formazione "de novo", cavitazione, tribonucleazione, micronuclei gassosi pre-esistenti (figura 17)

Perchè si formano le bolle?

- Formazione "de novo"
- Cavitazione
- Tribonucleazione
- Micronuclei gassosi

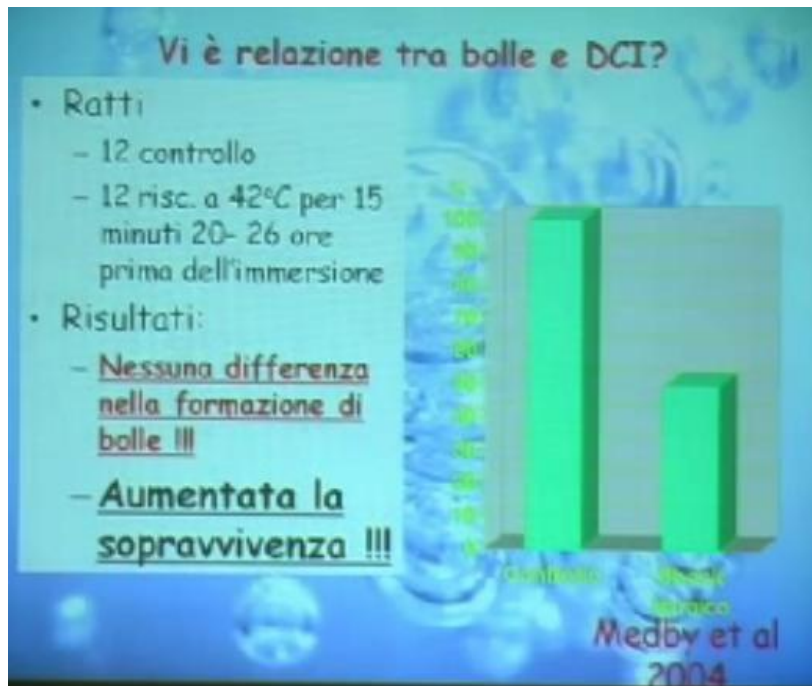


Per quanto affascinante sia l'ipotesi, nella realtà non vi è correlazione significativa tra grado doppler di bolle e probabilità di incidente da decompressione (figura 18)

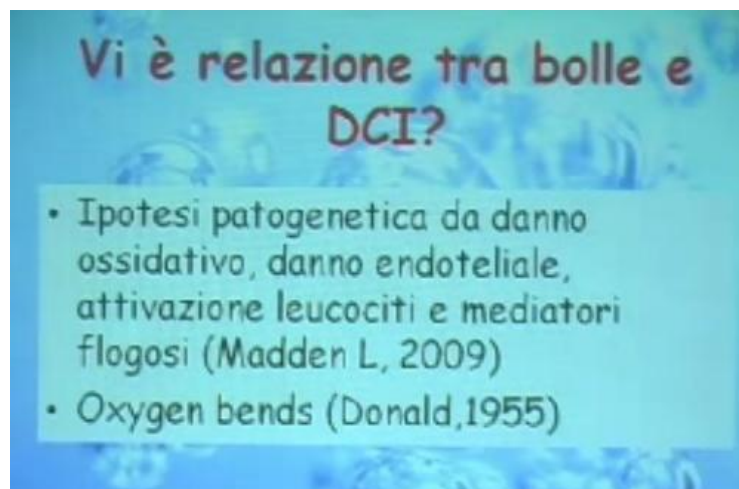
Vi è relazione tra bolle e DCI?

Bubble Grade	Air Diving (% DCS)
0	0
1	1
2	1
3	6
4	10

Il preconditionamento (per esempio con il riscaldamento con sauna) riduce la probabilità di DCI in diverse immersioni a parità di grado doppler di bolle.



Attualmente si è consapevoli che le bolle non siano le uniche responsabili dell'incidente da decompressione (vedi la relazione di Stephen Thom sulle micro particelle)



La U.S. Navy sta effettuando ricerche per valutare l'utilizzo del polietilenglicole, utilizzato da Thom per separare le microparticelle, o altra sostanza per trattare l'incidente da decompressione senza ricomprimere il paziente in camera iperbarica (questo sarebbe utile per i sommergibilisti).

Discussione: Corrado Costanzo chiede informazioni sulla variabilità individuale nella suscettibilità all'incidente da decompressione (a parità di errore, capita che un subacqueo abbia l'incidente e l'altro no).

Stefano Brambilla: "ma la preossigenazione funziona perché riduce la formazione di bolle? Non potrebbe essere che pre-ossigenando il subacqueo a sei metri di profondità, l'ossigeno blocchi a priori la cascata dell'infiammazione prevenendo i sintomi - indipendentemente dalla quantità di bolle?"

Pasquale Longobardi: "La mia opinione è che l'ossigeno determini la nitrosilaminazione del citoscheletro del neutrofilo riducendo l'espressione delle $\beta 2$ integrine (quindi riduce la risposta infiammatoria). Inoltre ossigeno + arginina = monossido di azoto (NO) che protegge l'endotelio riducendo la diapedesi dei neutrofili (quindi l'infiammazione).

Fabio Faralli: "al momento gli studi sono sperimentali e non si è autorizzati a utilizzare la pre-ossigenazione come prevenzione della DCI"

Pasquale Longobardi: "Fabio Faralli, per piacere, potresti definire un profilo di immersione (profondità/tempo) che serva come limite di riferimento per introdurre le soste profonde (deep stop), per esempio: soste profonde solo per immersioni più profonde di 27 metri e/o più lunghe di 50-60 minuti. Grazie"

Fabio Faralli: "consiglio l'introduzione della sosta profonda solo per immersioni lunghe entro i 25-27 metri di profondità massima. Per immersioni più profonde e brevi, la sosta profonda potrebbe aumentare la probabilità di incidente da decompressione".

Un uditore segnala che con i computer basati su RGBM se si attiva l'opzione "Deep Stop" viene eliminata la sosta di sicurezza a cinque metri