

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di Laurea Triennale in Scienze Motorie

Tesi di Laurea

**OXY INFIAMMAZIONE NELLE ATTIVITA'
SUBACQUEE**

Relatore: Prof. Gerardo Bosco

Laureando: Dissegna Stefano

N° di matricola: 2023783

Anno Accademico 2023/2024

Indice

Introduzione

CAP 1. Meccanismi correlati allo stress ossidativo e infiammazione sistemica

- 1.1 Stress ossidativo
- 1.2 Ossido nitrico
- 1.3 Antiossidanti endogeni/esogeni
- 1.4 Infiammazione sistemica

CAP 2. Ipossia

- 2.1 Attività subacquee: un modello di ipossia intermittente
- 2.2 Immersioni in subacquea
- 2.3 Immersione in apnea

CAP 3. Iperossia

- 3.1 Immersioni in subacquea: un modello di iperossia
- 3.2 Immersioni di saturazione

Conclusioni

Introduzione

Gli esseri umani e la maggior parte degli organismi animali si sono adattati a vivere nell'atmosfera terrestre, dove la frazione di ossigeno inspirato (F_{iO_2}) è di circa il 21%. L'ossigeno (O_2) è il terzo elemento chimico più abbondante nell'universo, dopo l'idrogeno (H) e l'elio (He) e il primo per abbondanza sulla crosta terrestre (87%) ed è di fondamentale importanza per la respirazione di tutti gli esseri viventi sulla crosta terrestre (animali e piante), per i processi di combustione e di ossidazione. [1].

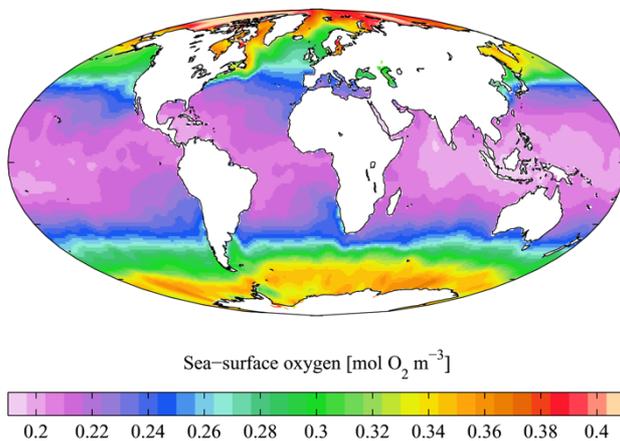


FIGURA 1: descrive i livelli superficiali di ossigeno nelle acque, mostrando come avvicinandosi ai poli, questi aumentano.

L' O_2 è il costituente principale dei composti inorganici di gusci, denti e ossa animali. L' O_2 è l'accettore terminale degli elettroni nella fosforilazione ossidativa, fornendo la maggior parte dell'energia biologica praticamente in tutte le forme di vita animali. L' O_2 è l'ultimo accettore di elettroni nei processi catabolici che convertono l'energia biochimica dai nutrienti in ATP, “la valuta” molecolare del trasferimento di energia intracellulare [2]. Questo processo avviene attraverso l'uso di trasportatori di elettroni, come la nicotinammide adenina dinucleotide (NAD^+), che viene ridotta nel processo ricevendo elettroni dalle molecole bersaglio e viene ossidata nuovamente donando elettroni all' O_2

attraverso la fosforilazione ossidativa [3]. Questo processo avviene tra la membrana mitocondriale interna ed esterna. La presenza di O₂ nei tessuti umani consente alle cellule di produrre adenosina trifosfato, (ATP: una molecola di adenina e una di ribosio - zucchero a 5 atomi di carbonio) per molecola di glucosio attraverso il ciclo di Krebs (figura 2) e la fosforilazione ossidativa. La glicolisi anaerobica (in assenza di O₂) fornisce l'energia solo per 2 ATP. Il metabolismo dei lipidi richiede anche ossigeno: il metabolismo del palmitato di acidi grassi, per esempio, produce 129 ATP mentre utilizza 31 mol di O₂.

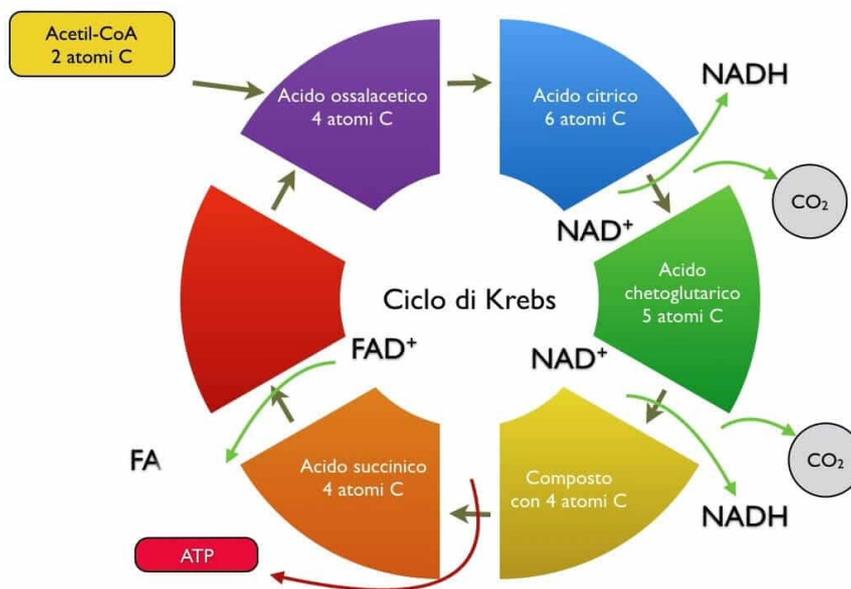


FIGURA 2: Ciclo di Krebs

Respirare aria a pressione iperbarica (la pressione ambientale aumenta di un'atmosfera ogni 10 m di profondità) [4] aumenta necessariamente la pressione parziale di O₂ (pO₂) nella circolazione con aumento del rilascio di radicali liberi e aumento della resistenza vascolare a causa della vasocostrizione legata all'iperossia [5]. La tossicità da ossigeno è una condizione derivante dagli effetti dannosi della respirazione di O₂ ad un aumento della pressione parziale come in profondità, e si sviluppa per la maggior parte quando la pressione parziale di ossigeno raggiunge valori pari o superiori a 1,4 atmosfere,

equivalenti a una profondità di circa 57 metri respirando aria; questo può portare a danni cellulari a livello del sistema nervoso centrale (SNC) [6], del sistema polmonare [7] e degli occhi [8]. La tossicità nel SNC è correlata al valore di pO₂ e all'esposizione temporale [9]. Può verificarsi come conseguenza dell'esposizione a condizioni iperbariche che si manifestano con cambiamenti visivi come visione a tunnel, tinnito, nausea, contrazioni facciali, cambiamenti comportamentali (confusione, irritabilità, ansia), vertigini [10]. L'esposizione a livelli elevati di pO₂ può anche portare a una patologia nota come tossicità polmonare da ossigeno (Polmonary Oxigen Toxicity - POT). Patologia importante e in continuo aumento a causa dell'aumento delle varianti di immersione, che includono miscele di gas arricchite di ossigeno ed immersioni tecniche. Ad oggi, non esiste ancora un metodo soddisfacente e praticabile per calcolare il rischio di tossicità da ossigeno durante un'esposizione ad ossigeno iperbarico.

I subacquei possono mostrare diversi sintomi tra cui irritazione tracheale, tosse, atelettasia, edema interstiziale, infiammazione e fibrosi [7].

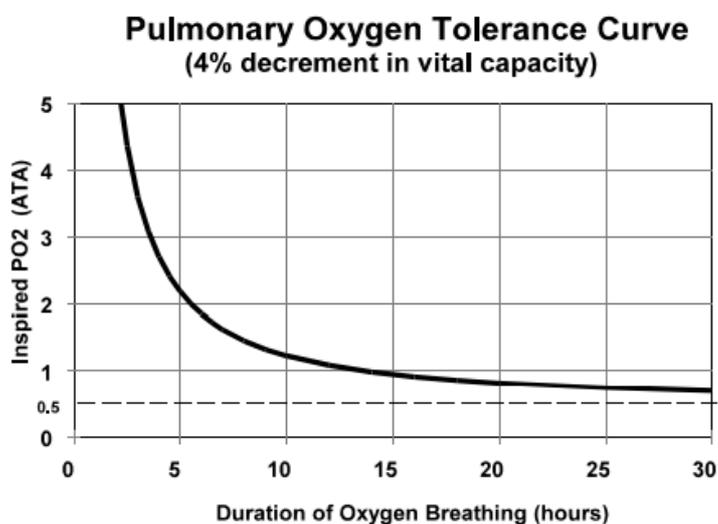


FIGURA 3: curva che rappresenta l'equazione per il calcolo la tossicità polmonare dell'ossigeno sviluppata empiricamente dalle curve di tolleranza all'ossigeno polmonare.

CAP 1.

Meccanismi correlati allo stress ossidativo e infiammazione sistemica

1.1 Stress ossidativo

L'esposizione agli agenti esogeni quali ad esempio: farmaci, "cibo spazzatura", inquinanti, gas di scarico, raggio UV e gamma, sono eventi potenzialmente dannosi e possono direttamente o indirettamente alterare l'omeostasi redox. Vivendo in un ambiente aerobico, la generazione di ossidanti potenzialmente tossici è, ovviamente, un fenomeno inevitabile. Le conseguenze delle alterazioni ossidative sono spesso indicate come "stress ossidativo", che è probabilmente uno dei termini meno definiti e più abusati nella biochimica e nella fisiologia cellulare. Secondo una delle definizioni più complete, lo stress ossidativo è "lo sbilanciamento dello stato redox, ovvero del mancato mantenimento dello stato stazionario redox fisiologico, con incremento delle sostanze ossidanti e diminuzione delle sostanze antiossidanti" [12]. Esistono vari tipi di radicali liberi, alcuni composti solamente da Idrogeno e Ossigeno (ROS) e altri che contengono anche Azoto (RNS). La caratteristica comune a queste specie reattive è che cercheranno di strappare elettroni ad altri atomi per raggiungere la stabilità elettronica nel loro guscio esterno.

Reactive Oxygen Species (ROS)		Reactive Nitrogen Species (RNS)	
Free radical	Structural formula	Free radical	Free radical
Superoxide anion	O_{2^-}	Nitric oxide	NO
Hydrogen peroxide	H_2O_2	Nitrous oxide	N_2O
Hydroxyl radical	$OH\cdot$	Peroxynitrite	NO_{3^-}
Peroxyl radical	OH_{2^-}	Nitroxyl anion	HNO
Peroxynitrous acid	HNO_3		

FIGURA 4: Tabella dei ROS (specie reattive dell'ossigeno), RNS (specie reattive dell'azoto).

Name	Formula	Characteristics
Hyperoxide/ superoxide	$\cdot\text{O}_2^-$	Highly unstable, signaling function, synaptic plasticity
Hydrogen peroxide	H_2O_2	Cell toxicity, signaling function, generation of other ROS
Hydroxyl radical	$\cdot\text{OH}$	Free radical, highly unstable, very reactive agent
Alkoxy radical	$\text{RO}\cdot$	Free radical, reaction product of lipids
Peroxy radical	$\text{ROO}\cdot$	Free radical, reaction product of lipids
Hypochlorite anion	OCl^-	Reactive oxygen species, reactive chlorine species, enzymatically generated by myeloperoxidase
Singlet oxygen	$^1\text{O}_2$	Induced/excited oxygen molecule, radical and nonradical form
Ozone	O_3	Environmental toxin
Nitric oxide	$\cdot\text{NO}$	Environmental toxin, endogenous signal molecule
Peroxynitrite	ONOO^-	Highly reactive reaction intermediate of $\cdot\text{O}_2$ and $\cdot\text{NO}$
Nitrogen dioxide	$\cdot\text{NO}_2$	Highly reactive radical, environmental toxin
Nitrogen oxides	NO_x	Environmental toxins, including NO and $\cdot\text{NO}_2$, derived from the combustion process

Abbreviations: RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species.

FIGURA 5: Tabella con ROS e RNS, caratteristiche e differenze.

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono radicali liberi derivati dall'O₂ che coinvolgono una serie di ossidanti come il perossido di idrogeno (H₂O₂), i perossidi lipidici (LOOH), l'ossigeno singoletto (1O₂), il radicale idrossile (•OH), il radicale perossilico (ROO•), l'anione superossido (•O₂⁻) tra questi, i radicali attirano molta attenzione perché possono portare alla carcinogenesi danneggiando il DNA e le proteine e causare malattie cardiovascolari ossidando LDL [13-15]. Poiché l'O₂ molecolare ha due elettroni non accoppiati in orbitali separati nel suo guscio elettronico esterno, un aumento della disponibilità di O₂ porta ad un aumento della riduzione incompleta dell'O₂, che produce l'anione superossido (•O₂⁻), •OH e H₂O₂. Il primo prodotto di riduzione dell'O₂ è il •O₂⁻, che è in equilibrio con l'acido debole, il radicale idroperossilico. La riduzione dell'anione superossido produce H₂O₂. La riduzione di H₂O₂ provoca una reazione di scissione omolitica, che rilascia •OH e OH⁻. •O₂⁻ e •OH sono radicali liberi (composti con un singolo elettrone non accoppiato nell'orbitale esterno). L'H₂O₂ non è un radicale libero ma è tossico di per sé perché è un precursore immediato dei radicali liberi. In termini di reattività con i costituenti biologici (acidi nucleici, proteine e lipidi), il •OH è il più reattivo, ma tutti i ROS hanno un'emivita estremamente breve (10⁻⁹ s) [16]. I lipidi contengono spesso doppi legami coniugati e sono esposti alla perossidazione a contatto con ROS. Con quattro doppi legami, l'acido arachidonico è il più facilmente ossidato tra gli acidi grassi. Questa ossidazione è una reazione a catena che può influenzare diverse molecole di lipidi contemporaneamente [16].

Il ruolo critico e "doppio" dell'O₂ e delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) negli organismi aerobici implica che una produzione moderata e finemente sintonizzata di specie reattive è cruciale nella biologia cellulare all'interno di un intervallo specifico e un sistema difensivo specifico cellulare che previene fisiologicamente il possibile eccesso di ROS. La perturbazione di questo equilibrio dinamico adattivo fisiologico, indotta da una causa persistente o da una risposta di feedback inappropriata, porta allo stato infiammatorio [2, 12].

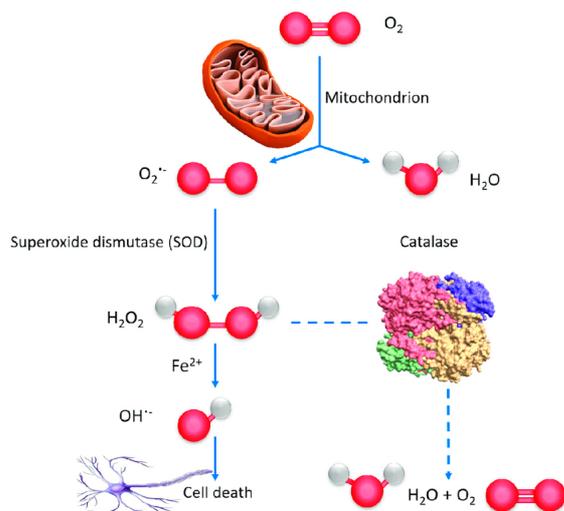


FIGURA 6: La riduzione del radicale superossido da parte di SOD (superossido dismutasi) e CAT

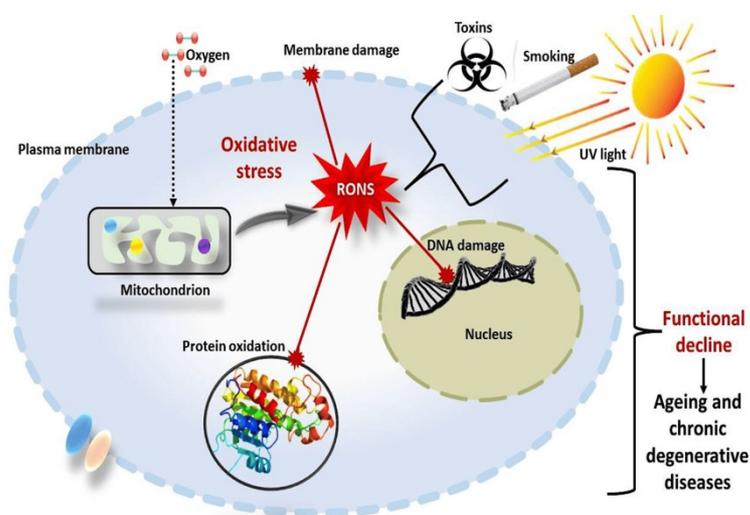


FIGURA 7: Rappresentazione schematica dello stress ossidativo in seguito all'avanzare dell'età e le malattie degenerative. È caratterizzato da un accumulo di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (RONS) in cellule e tessuti, danneggiando il DNA, proteine e i lipidi, causando invecchiamento e malattie degenerative [17]

1.2 Ossido nitrico (NO)

L'ossido nitrico (NO) è un'importante molecola di segnalazione coinvolta in molti processi fisiologici e patologici, in particolare la vasodilatazione [18]. NO regola sia il diametro dei vasi sanguigni che il flusso sanguigno, rappresentando così una molecola di segnalazione critica per controllare il tono vascolare [19]. L'eccesso di NO predispone la succinato-citocromo c reduttasi mitocondriale a produrre HO• [20]. La formazione di NO è catalizzata da una famiglia di NO sintasi (NOS), almeno tre isoforme con diverse localizzazioni intracellulari che riflettono le varie funzioni di NO [21]. La relazione tra O₂ e l'attività NOS endoteliale (eNOS) si basa sull'osservazione che nei tessuti normossici intatti, l'eNOS è solitamente esposto a quantità saturanti di O₂, come previsto dai valori di Km complessivi apparenti per O₂ che sono circa $16,6 \pm 2,0$, $5,5 \pm 1,1$ e $4,5 \pm 0,6$ mmHg per le NO sintasi rispettivamente del cervello, endoteliali e dei macrofagi.[22]. Si prevede che un paO₂ elevato possa influenzare l'attività complessiva delle NOS, che è quindi dinamicamente legata alla FiO₂ [22]. Nei modelli animali, FiO₂=0.8 per 6 ore o 6 giorni regola l'mRNA NOS inducibile (iNOS) in specifiche regioni del cervello, causando danni cellulari attraverso la sovrapproduzione di agenti nitranti [23, 24].

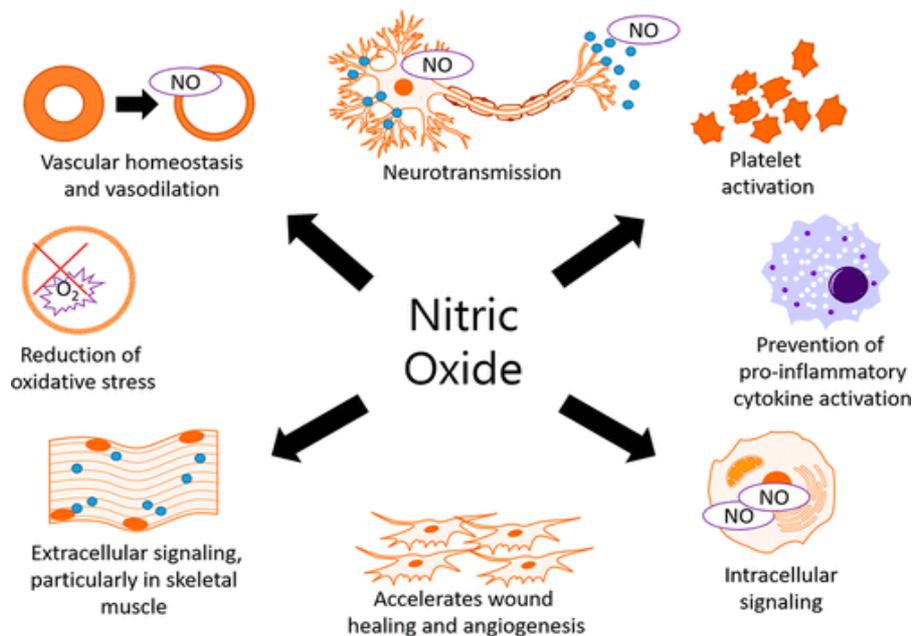


FIGURA 8: Ruoli dell'Ossido Nitrico (NO), regolazione del diametro dei vasi, attivazione delle piastrine, segnalazione intra/extracellulare.

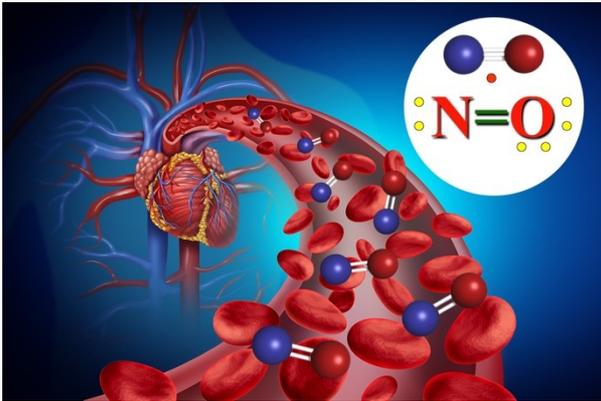


FIGURA 9: L'Ossido Nitrico regola il tono vascolare e di conseguenza il flusso sanguigno.

1.3 Antiossidanti endogeni ed esogeni

Gli antiossidanti sono sostanze capaci, anche se presenti in piccole quantità, di ritardare o inibire i processi di ossidazione di materiali sensibili alla degradazione da parte di ROS e RNS. Possono essere classificati in due principali categorie a seconda della loro provenienza: Endogeni (enzimi, proteine o altre molecole come l'acido urico o la bilirubina, prodotti dal corpo) ed Esogeni (vitaminici e non vitaminici come carotenoidi e polifenoli assimilati attraverso l'alimentazione).

Diversi enzimi endogeni, come la superossido dismutasi (SOD), la glutatione perossidasi (Gpx) e la catalasi (CAT), riducono l'idroperossido e l' H_2O_2 , bloccando la formazione di radicali liberi [25-27]. SOD catalizza la dismutazione di due molecole di $\bullet O_2^-$ per produrre H_2O_2 e O_2 [28] mentre Gpx riduce H_2O_2 a H_2O [29]. La CAT blocca l'inizio rimuovendo il perossido di idrogeno, che si decompone in specie non radicaliche [30]. Gli antiossidanti che rompono la catena, noti anche come antiossidanti che intrappolano i radicali, bloccano l'autossidazione competendo con la catena della reazione di propagazione. Questi, reagiscono con i radicali perossili più rapidamente di quanto possano attaccare il substrato ossidabile, e i prodotti di tale reazione non continuano la reazione da catena di autossidazione. Gli antiossidanti a piccole molecole più critici ed efficaci sono i chain-breaking: possono intrappolare diversi radicali perossidici per molecola antiossidante, a seconda della stechiometria di reazione [31].

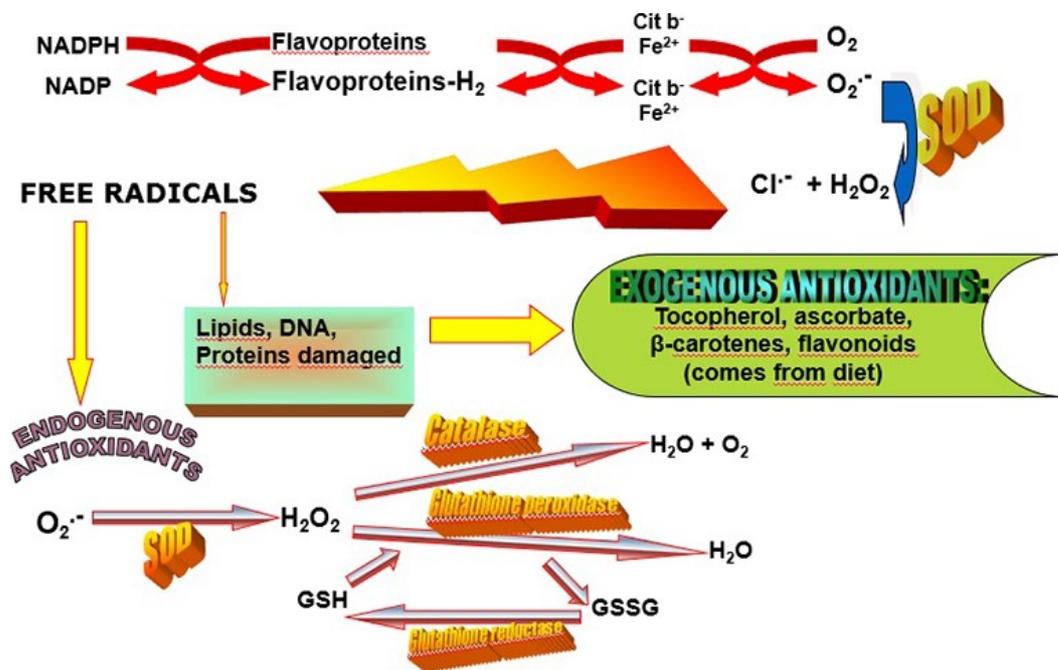


FIGURA 10: Neutralizzazione dei ROS dagli antiossidanti endogeni ed esogeni.

L'approccio più efficace e conveniente per proteggere le molecole dalla reattività dell'ossigeno è usare antiossidanti esogeni. Gli antiossidanti attirano molta attenzione poiché le malattie legate all'età e le malattie degenerative sono collegate alle macromolecole biologiche ossidanti indotte dai ROS e dalle specie reattive dell'azoto (RNS). Gli antiossidanti preventivi interferiscono con il processo iniziale, bloccando la formazione di radicali liberi. I loro prodotti di decomposizione sono i radicali idrossile e alcossile, che avviano la reazione a catena [25].

Gli antiossidanti esogeni si ottengono principalmente da alimenti di origine vegetale. Essi vengono classificati in: Carotenoidi (come il betacarotene dalle carote), Flavonoidi (quercitina e rutina, provenienti ad esempio da lamponi e mirtili), Istolocianati (da broccoli, cavolfiori, cavolo...), Tannini (da vino bianco e rosso, melograni, cachi e noci), Resvatrolo (da succo d'uva, arachidi, vino rosso e mirtili).

Antiossidanti negli alimenti:				
Frutta e verdura giallo-arancio		Ricca di polifenoli e vitamina C		
Frutta e verdura viola -blu		Ricca di flavonoidi e carotenoidi		
Frutta e verdura rossa		Ricca di licopene e antocianine		
Frutta e verdura verde		Ricca di resveratrolo e carotenoidi		
Semi oleosi e pesce		Ricchi di acidi grassi essenziali		
Cereali integrali		Ricchi di minerali		

FIGURA 11: Tabella che rappresenta una suddivisione degli alimenti vegetali in base al colore e al tipo, con associati gli antiossidanti in essi contenuti.

1.4 Infiammazione sistemica

L'infiammazione è la risposta non specifica dei tessuti del corpo a stimoli dannosi, inclusi agenti patogeni, cellule danneggiate o sostanze irritanti [32]. I tipici segni di infiammazione includono l'aumento del flusso sanguigno, la dilatazione capillare, l'infiltrazione di leucociti e il rilascio di mediatori chimici coinvolti nell'iniziare la riparazione dei tessuti danneggiati e l'eliminazione di agenti nocivi [33]. La risposta infiammatoria inizia ad attivare gli astrociti, il tipo di cellula gliale più abbondante nel cervello umano, che producono un'ampia varietà di citochine, chemochine e fattori di crescita, tra cui interleuchina-2 (IL-2), IL-4, IL-8, IL-10, chemochina (C-C motif) ligando 2 (CCL2), CCL5, fattore di crescita trasformante beta (TGF- β) e fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α) [34]. Il rilascio di citochine e chemochine attiva neutrofili e macrofagi, le cellule primarie nella risposta infiammatoria [35].

I ROS esacerbano l'espressione di citochine pro-infiammatorie, come IL-1, IL-6 e TNF- α e iNOS attraverso l'attivazione del fattore nucleare kappa-light-chain-enhancer della via delle cellule B attivate (NF- κ B) [36, 37]. Queste citochine attivano i leucociti per generare più radicali liberi [36]. Questa interazione tra ROS e citochine porta a un ciclo autosufficiente tra tempesta di citochine e stress ossidativo, che potrebbe portare alla sindrome da disfunzione multiorgano [39].

Qui, usiamo il termine "Oxy-Inflammation" per descrivere una condizione pre-patologica caratterizzata da uno stress ossidativo cronico e sistemico ben documentato all'interno di un circolo vizioso associato a un'inflammatione cronica lieve-subclinica. Questa condizione, caratterizzata da un squilibrio dalla soglia dell'omeostasi redox adattiva, predispone l'organismo a un continuo effetto dannoso dello stress ossidativo. Questo danno ossidativo innesca a sua volta, una costante risposta pro-infiammatoria subclinica che è una caratteristica standard per diverse malattie a livello preclinico e clinico e può avere un ruolo nello sviluppo di condizioni patologiche.

Qui di seguito uno schema che illustra la sinergia tra i ROS e lo stato infiammatorio, con il ruolo degli antiossidanti nello sviluppo di patologie respiratorie.

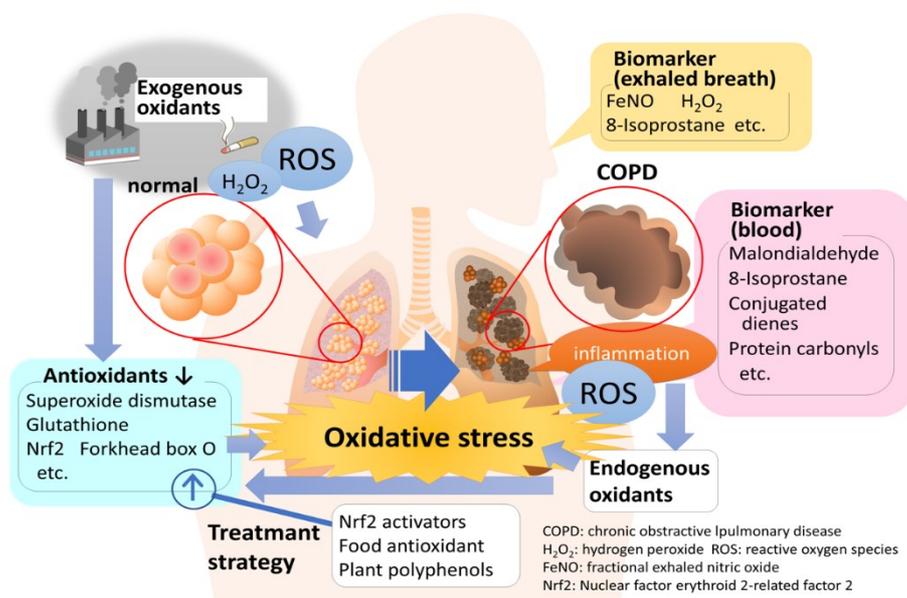


FIGURA 12: Sinergia tra ROS e stato infiammatorio nello sviluppo di patologie respiratory, con il ruolo degli antiossidanti. [38]

CAP 2. L' Ipossia

L'ipossia è una condizione in cui l'O₂ non è disponibile in quantità sufficienti a livello dei tessuti per mantenere un'adeguata omeostasi; questa può derivare da un'inadeguata somministrazione di ossigeno ai tessuti a causa del basso apporto di sangue o del basso contenuto di ossigeno nel sangue (ipossiemia). La risposta infiammatoria è associata a profondi cambiamenti [40] causati dall'aumento del consumo di O₂, dalla generazione di grandi quantità di ROS e dall'esaurimento locale dei nutrienti, con conseguente profonda ipossia tissutale [41]. L'ipossia promuove la generazione di ROS derivata da diversi meccanismi cellulari, tra cui la catena di trasporto degli elettroni mitocondriale e la nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ossidasi (NADPH), il reticolo endoplasmatico e vari enzimi, tra cui la xantina ossidasi (XO) [42]. Lo stress ossidativo correlato all'ipossia porta alla formazione di marcatori di danno al DNA come 8-oxo-7,8-diidro-2'-deossiguanina (8-oxo-dG) (dalla reazione di •OH con anello di guanina) [43] e indici di perossidazione lipidica tra cui 4-idrossinonenal (4-HNE) [44]. Lo stress ossidativo e l'infiammazione possono essere considerati processi interconnessi. Il rilascio di 8-oxo-dG attiva NFκB, espressione di chemochine/citochine pro-infiammatorie e reclutamento di cellule infiammatorie tramite la proteina attivata dal mitogeno (MAP) e la chinasi fosfoinositide-3 (PI3) [45]. L'espressione di Nrf2 indotta da ROS regola l'eme ossigenasi-1 (HO-1), che è citoprotettiva contro il danno ossidativo [46]. Una fiO₂ ridotta innesca una risposta infiammatoria che avvia la protezione dei tessuti e i meccanismi di riparazione [47], con il rilascio di fattore inducibile dall'ipossia (HIF) per adattarsi a bassi livelli di O₂ [48]. La famiglia dei fattori HIF è il sensore molecolare onnipresente più noto del livello intracellulare di O₂. Gli HIF sono eterodimeri che costituiscono un complesso di trascrizione stabilizzato dall'ipossia [49], consentendo l'adattamento cellulare attraverso la regolazione verso l'alto o verso il basso di geni e proteine correlati all'ipossia [50], i quali, alla fine influenzano le vie metaboliche cellulari come la glicolisi, la differenziazione cellulare, l'angiogenesi e la riparazione. Sebbene siano note diverse isoforme di HIF, ognuna con localizzazione, funzione e comportamento diversi [51], HIF-1 è la più abbondante, anche se probabilmente non la più importante delle varie isoforme.

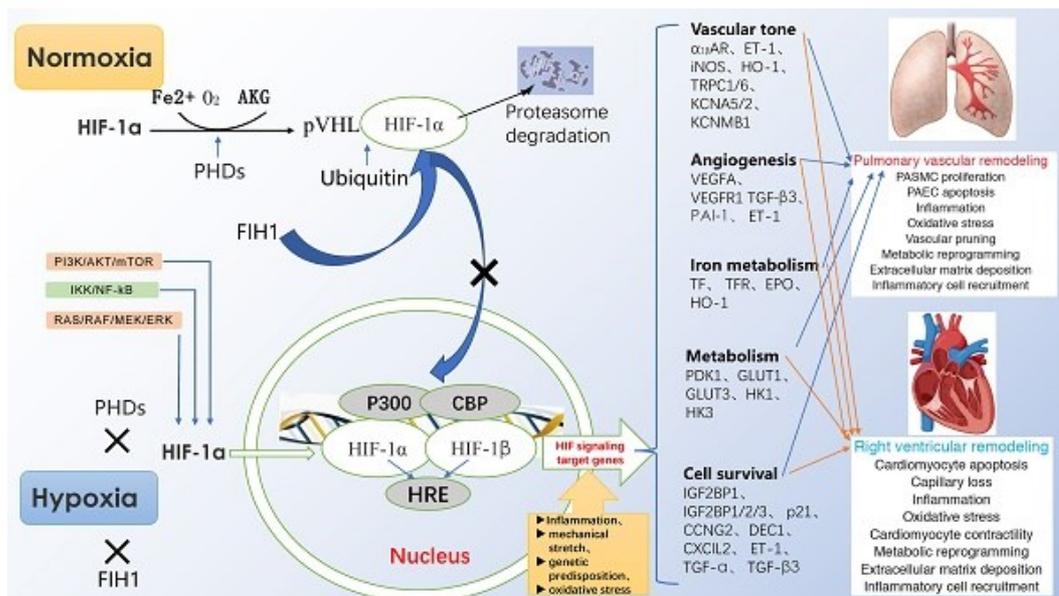


FIGURA 13: Regolazione dell'espressione di HIF-1^o, vie di attivazione trascrizionale e attivazione del gene bersaglio. [52]

2.1 Attività subacquee: un modello di ipossia intermittente

Negli esseri umani, la gestione dell'ossigeno è di fondamentale importanza in contesti clinici, in cui sia le condizioni acute che croniche come il trapianto di organi e l'ipossia intermittente contribuiscono alle lesioni ischemiche. Nell'uomo, l'ipossiemia induce la lesione tissutale e la morte cellulare attraverso vie infiammatorie necrotiche e apoptotiche. La limitata disponibilità di ossigeno durante l'ipossia compromette la respirazione mitocondriale, portando a un calo dei livelli intracellulari di ATP. Un aumento della disponibilità di ossigeno dopo l'ipossia aumenta la generazione di ossidanti dai sistemi enzimatici (ad esempio: xantina ossidasi e NADPH ossidasi) e mitocondri, minacciando ulteriormente la salute di cellule, tessuti e addirittura la salute e la sopravvivenza dell'organismo. Le lesioni da ripercussione sono ben documentate nell'uomo, in particolare per quanto riguarda l'infarto al miocardio, l'ictus ischemico e il trapianto di organi. [58]

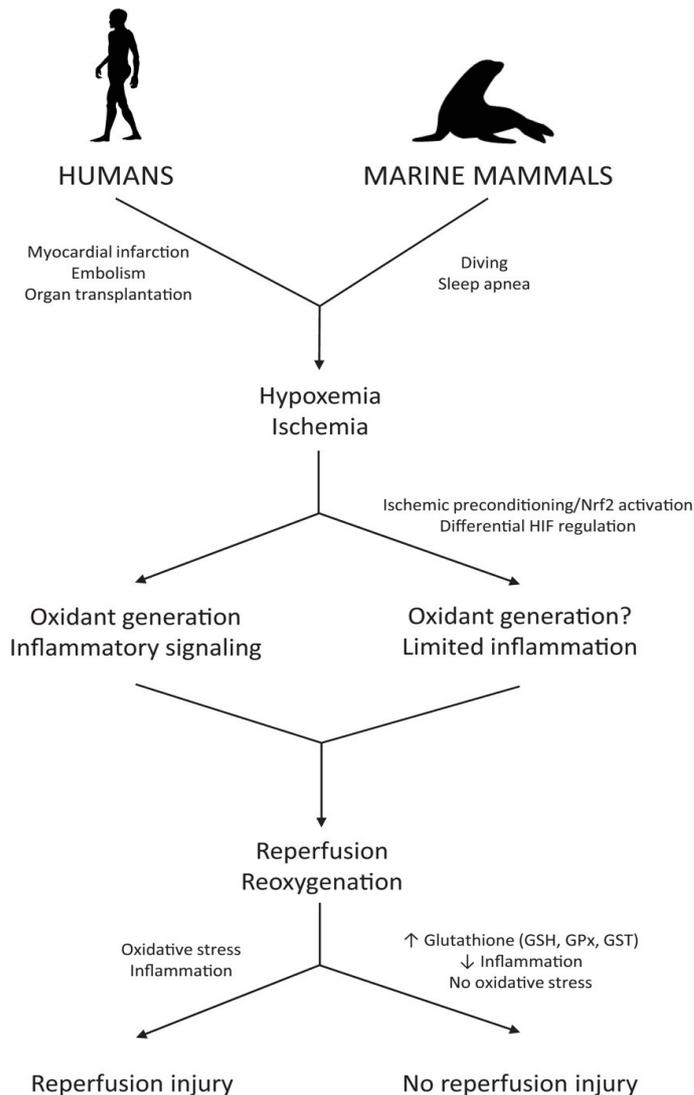


Figura 14: Meccanismi biochimici che portano alla prevenzione delle lesioni da riperfusione nei mammiferi subacquei. Gli eventi di ischemia/riperfusione sono associati allo stress ossidativo e all'infiammazione nell'uomo, ma sono ben tollerati dai mammiferi subacquei

L'ipossia intermittente (IH) è caratterizzata da cicli periodici e alternati di ipossia e normossia, ipercapnia e iperossia [53]. L'esposizione HI varia nella durata del ciclo, nel numero di episodi ipossici/normossici e nei giorni di allenamento. Da brevi episodi di ipossia (1-10 min), alternati da episodi di 1-20 minuti di normossia in 1 giorno [55] a esposizioni giornaliere più lunghe (1-12 h) variavano da 2 a 90 giorni [56].

L'adattamento all'IH migliora le funzioni del sistema nervoso autonomo, la rigidità arteriosa, la funzione endoteliale arteriosa e la funzione emorieologica [57, 58]. D'altra parte, i miglioramenti nella capacità di esercizio fisico possono essere dovuti ad adattamenti non ematologici, tra cui aumento dell'efficienza ventilatoria, aumento del volume e del metabolismo dell'ictus, miglioramento dell'efficienza mitocondriale e regolazione del pH muscolare [59, 60]. L'esercizio a bassa intensità combinato con IH modula significativamente il sistema immunitario e i parametri infiammatori, tra cui l'espressione delle citochine, la biodisponibilità NO e i marcatori di stress ossidativo [61]. Durante l'allenamento, il corpo umano può attivare difese antiossidanti endogene per proteggere le macromolecole biologiche dai radicali liberi. Anche i livelli circolanti di enzimi antiossidanti endogeni aumentano acutamente in risposta all'esercizio ad alta quota, tra cui SOD e catalasi CAT [62, 63].

2.2 Immersioni in subacquea

Le immersioni in quota sono tipicamente praticate nei laghi di montagna, influenzando il requisito di decompressione per un'immersione. Le profondità di stop e i tempi di decompressione utilizzati per le immersioni in quota sono diversi da quelli utilizzati per lo stesso profilo di immersione a livello del mare [64, 65]. Tuttavia, al rientro alla superficie, la diminuzione della pressione atmosferica nell'ambiente può esacerbare lo "stress di decompressione" sul subacqueo, aumentando il rischio di insorgenza della malattia da decompressione (DCS) rispetto allo stesso profilo di a livello del mare [66]. Inoltre, l'acclimatazione in quota svolge un ruolo cruciale come precauzione, poiché anche i subacquei con carichi di gas vicino al livello del mare possono essere a maggior rischio di DCS [66]. Per questo motivo, è consigliabile eseguire la prima immersione 12 ore dopo l'arrivo in quota [67].

Le modifiche più comuni alle tabelle di decompressione in quota sono le correzioni cross-high-altitude derivate dalla US Navy [65]. Alcuni autori hanno proposto un arresto extra all'ultima fase di decompressione (3 m per le immersioni in mare) per 1 minuto dopo un arresto sicuro nelle immersioni non di decompressione [68].

L'immersione in quota può essere un esempio di IH con cicli alternati di ipossia (prima e dopo l'immersione) e normossia/iperossia durante l'immersione. Condizioni di aria fredda, secca e umida sono comuni ad alta quota e possono compromettere la funzione respiratoria con irritazione bronchiale ed effetti che vanno da una tosse minore a respiro sibilante asmatico [69].

Le immersioni in altitudine possono portare a cambiamenti di emo-concentrazione che si verificano come funzione protettiva dell'acclimatazione, con aumenti del valore di eritropoietina osservati già 2 ore dopo l'arrivo in altitudine e un aumento della massa dei globuli rossi entro 2-4 giorni [69]. Inoltre, Bosco et al. hanno osservato un forte aumento dell'attivazione piastrinica in soggetti che si sono tuffati ad alta quota (3000 m) [70]. L'attivazione delle piastrine può essere correlata a drastici cambiamenti di pressione [71] e all'adattamento del corpo umano a un ambiente freddo [72].

2.3 Immersioni in apnea (Breath-hold)

L'immersione in apnea, (Breath-hold - BH) richiede un adattamento fisiologico legato alla pressione idrostatica superiore al normale. Questa attività comprende complessi adattamenti cardiovascolari collettivamente definiti "risposta subacquea", inclusi cambiamenti come bradicardia, riduzione della gittata cardiaca, aumento della pressione arteriosa, vasocostrizione periferica e cambiamenti nella composizione dei gas ematici [73]. In BH-divers, il danno endoteliale indotto dall'ipossia potrebbe essere meno pronunciato perché l'ipossia si verifica nell'ultima parte della fase di ascesa di un'immersione. Allo stesso tempo, una grave iperossia si verifica durante la discesa e il tempo di fondo a causa dell'aumento della pressione ambientale e della compressione del torace [74, 75]. L'alternanza di iperossia/ipossia può essere un potente fattore scatenante per la disfunzione endoteliale e uno stress subacqueo più grave nelle immersioni BH ripetitive potrebbe portare a tensioni sul sistema cardiovascolare, sulla funzione vascolare e sull'integrità endoteliale. Le disfunzioni endoteliali nell'immersione breath-hold sono state riportate da Theunissen et al. [76, 77]: la riduzione della funzione vascolare dipendente dall'Ossido Nitrico (NO) è la conseguenza di una diminuzione della biodisponibilità NO, osservata anche in una riduzione dell'afte epizootica.

L'alta pO₂ può anche favorire lo stress ossidativo dovuto all'ambiente iperbarico, che aumenta la quantità di O₂ libero che può selezionare il disaccoppiamento mitocondriale e rappresentare una fonte indipendente di ROS [78]. Lo stress ossidativo è stato studiato in BH-diving [79, 80], confermando il suo ruolo nello sviluppo di disfunzioni endoteliali [81]. La sovrapproduzione di ROS e il conseguente danno ossidativo ai lipidi di membrana e la diminuzione della capacità antiossidante totale plasmatica (TAC) riflettono anche una condizione ipossica, che in BH-diving si verifica tipicamente negli ultimi metri sotto la superficie [82]. I livelli di concentrazione di neopterinina e creatinina sono aumentati, suggerendo una “compromissione della funzione renale” come probabile risposta fisiologica alle variazioni di pO₂ durante l'attività di immersione [82].

L'adattamento all'ipossia può portare al metabolismo degli aminoacidi (AA), come osservato da alcuni autori [83, 84], e l'ipossia potrebbe essere uno stimolo per il rilascio di AA nel flusso sanguigno. I cambiamenti degli AA ramificati possono derivare dal fabbisogno energetico legato alla massiccia attività vascolare mediata dalla muscolatura liscia. Allo stesso tempo, la serina e la taurina possono essere coinvolte nell'adattamento all'ipossia, specialmente durante la fase di ascesa della BH-dive [84].

Inoltre, l'esposizione prolungata all'ipossia, come le immersioni ad alta quota, può influenzare l'attività piastrinica, come riportato da alcuni autori [85], ma questo aspetto sembra correlato al pO₂ [70]. L'attivazione delle piastrine può essere indotta dall'infiammazione legata all'esercizio [86] che coinvolge i leucociti attraverso fattori solubili e l'interazione fisica con diversi recettori, tra cui la P-selectina piastrinica (CD62P), il ligando CD40 (CD40L), così come PSGL-1, CD40 e Mac-1 (integrina α M β 2, CD11b/CD18) sui leucociti [87, 88]. Le interazioni piastrina-leucocita facilitano il reclutamento dei leucociti e la loro fuoriuscita dai vasi nei siti di infiammazione, portando al rilascio di mediatore pro-infiammatorio dei leucociti ma, in alcuni casi, smorzando l'infiammazione [89, 90].

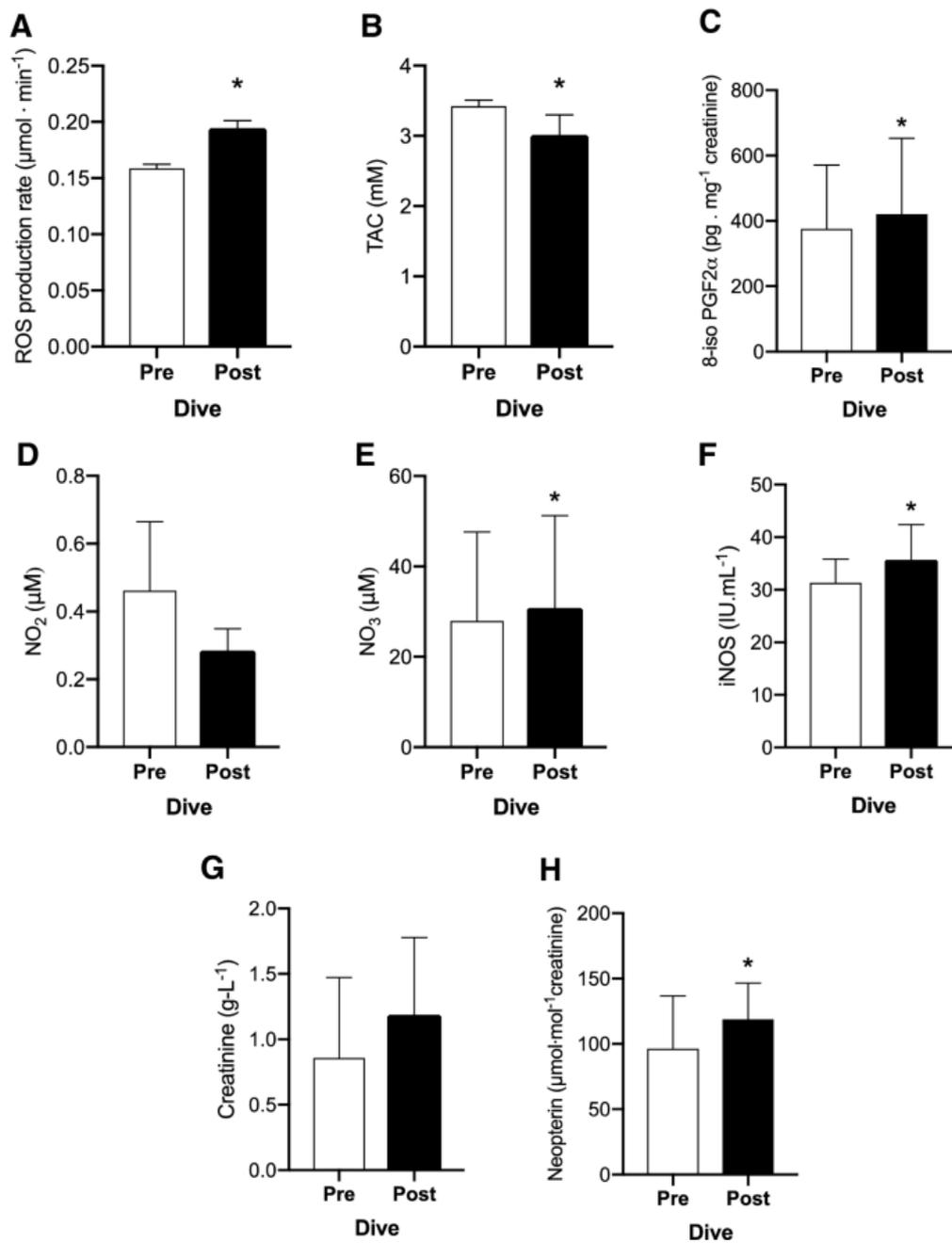
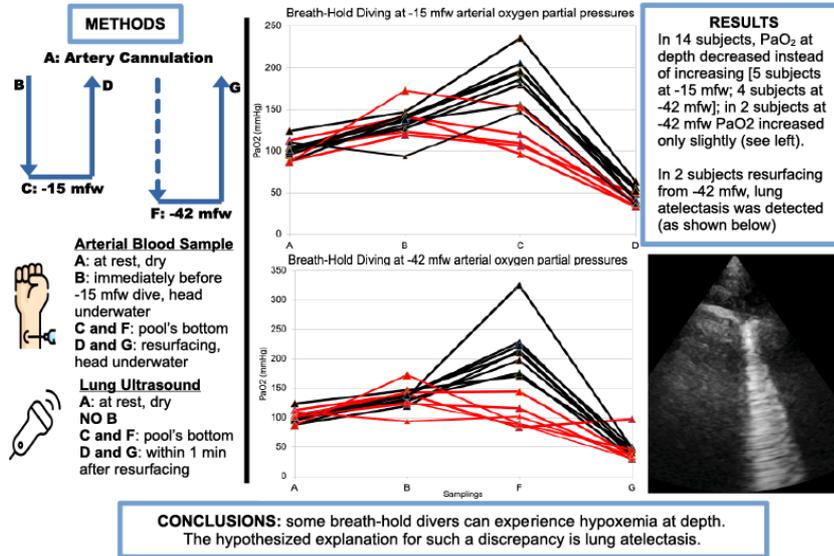


FIGURA 15: Valutazione dello stress ossidativo in immersioni in apnea; EJAP 2019

Relative Hypoxemia at Depth During Breath-Hold Diving Investigated Through Arterial Blood Gas Analysis and Lung Ultrasound



JOURNAL OF APPLIED PHYSIOLOGY. © 2023



Figura 16: E' stato rilevato, attraverso l'analisi dei gas presenti nel sangue e l'ecografia polmonare, che alcuni apneisti possono sperimentare una certa ipossiemia in profondità, si pensa dovuta all'atelettasia polmonare.

3. Iperossia

L'iperossia è ampiamente definita come la situazione in cui cellule, tessuti e organi sono esposti a un eccesso di apporto di O₂. Nei vertebrati con sangue circolante, questo si traduce in un aumento del contenuto di O₂ arterioso. Poiché la concentrazione media di O₂ nel sangue negli individui che respirano aria ambiente a livello del mare riflette una situazione in cui la pressione parziale arteriosa di O₂ (paO₂) varia da 80-100 mmHg, qualsiasi valore di paO₂ superiore a 100 mmHg è associato a iperossia [91], che si traduce in iperossia tissutale. Qualsiasi aumento della disponibilità di O₂, compresa l'iperossia, porta a una riduzione incompleta della molecola di O₂ nella fosforilazione ossidativa, che produce ROS e RNS. L'esposizione a iperossia prolungata può portare a danni cellulari attraverso la perossidazione lipidica, l'inattivazione degli enzimi e l'ossidazione di proteine e acidi nucleici, con conseguente apoptosi o necrosi [92].

L'iperossia a breve termine sembra ridurre e attenuare la produzione di citochine [93], l'espressione di $\beta 2$ -integrina necessaria per l'adesione dei leucociti [94] e la fagocitosi e l'uccisione dei macrofagi [95]. Nei modelli animali, alcuni autori hanno scoperto che l'iperossia potrebbe mitigare la risposta infiammatoria dopo l'assunzione di glucano [96, 97], ma gli effetti sono evidenti 20-48 ore dopo l'inizio dell' infiammazione [96]. D'altra parte, un alto livello di f_iO_2 può portare a una condizione di tossicità dell'ossigeno nei polmoni, caratterizzata da una risposta infiammatoria polmonare e da lesioni polmonari [98]. Le citochine pro-infiammatorie, tra cui TNF- α , proteina infiammatoria macrofagi-2 (MIP-2), PAI-1, IL-1 β , IL-6 e IL-8, sono state implicate nella mediazione dell'azione dei neutrofili nei polmoni iperossici [99] perché svolgono un ruolo cruciale nelle prime fasi della risposta infiammatoria [100]. Nell'infiammazione polmonare, alcuni autori hanno osservato un aumento della proteina 1 del gruppo ad alta mobilità (HMG-1) [101] che promuove il rilascio di IL-1 β , TNF- α , MIP-2 e fattore inibitorio della migrazione dei macrofagi.

3.1 Immersioni in subacquea: un modello di iperossia

Una delle attività più conosciute che porta all'iperossia sono le immersioni subacquee. Le immersioni subacquee espongono il corpo umano allo stress ambientale rappresentato dall'aumento del paO_2 , dello sforzo fisico e della resistenza respiratoria, che alterano la funzione endoteliale [102, 103]. I meccanismi che portano alla disfunzione endoteliale nelle immersioni subacquee possono derivare da un aumento dello stress ossidativo indotto dall'iperossia e dalla vasocostrizione periferica [103]. Le immersioni subacquee attivano la difesa antiossidante endogena per controllare l'aumento dello stress ossidativo dovuto all'alto paO_2 associato a condizioni iperbariche, suggerendo l'inizio della protezione dall'eccessiva deplezione di antiossidanti e dallo stress ossidativo [104]. L'iperossia associata alle immersioni subacquee si traduce nella produzione di ROS, che attiva il reclutamento della difesa antiossidante aumentando l'espressione di enzimi antiossidanti come CAT [71, 105], GPx [71, 106] e SOD [107]. La produzione di ROS stimola la mobilitazione dei linfociti poiché l'attività CAT aumenta entro poche ore dall'immersione, mentre l'attività GPx aumenta dopo l'affioramento. GPx è uno dei primi antiossidanti attivati per disintossicare i ROS [106]. L'attività SOD aumenta per

proteggere dalla perossitrite (ONOO-) e per preservare la generazione di NO [104, 108]. A causa della mobilitazione dei sistemi antiossidanti endogeni, la TAC aumenta dopo l'emergere per aiutare a controllare lo stress ossidativo vascolare, attivando una cascata di segnalazione che stimola la resistenza allo stress ossidativo correlato all'immersione [109].

I cambiamenti di pressione durante l'immersione e la decompressione possono influenzare significativamente il livello della componente ematocrito, compresi i leucociti e le piastrine [110, 111]. Alcuni autori hanno osservato che le immersioni subacquee non hanno influenzato il numero di linfociti ma le loro funzioni, poiché non hanno trovato alcun cambiamento nella produzione di H₂O₂ nei linfociti e le attività di GPx e CAT sono aumentate dopo l'affioramento [106]. D'altra parte, Morabito et al. hanno mostrato livelli significativamente ridotti di H₂O₂ nei linfociti, probabilmente a causa dell'aumento dell'attività CAT e degli enzimi antiossidanti endogeni [112].

La respirazione dell'aria in condizioni iperbarica porta alla formazione di emboli gassosi venosi (VGE) che interagiscono con l'endotelio [113], portando all'aggregazione piastrinica sulla superficie della bolla [114] e con conseguente formazione di microtrombo nei vasi polmonari dopo la decompressione nel modello DCS [115, 116]. La riduzione del pN₂ respirando aria nitrox (EAN) può ridurre l'attivazione piastrinica [117] e la respirazione di O₂ normobarico prima di un'immersione [105]. D'altra parte, l'esposizione alle miscele EAN e all'attività fisica correlata all'immersione può aumentare la generazione di ROS [103], i biomarcatori dello stress ossidativo tra cui 8-isoprostane e 8-deossiguanosina e marcatori infiammatori come IL-1 β , IL-6 e TNF- α [118]. Alcuni autori hanno osservato che una dieta chetogenica a breve termine è efficace nella perdita di peso, diminuendo l'infiammazione e proteggendo dalla perossidazione lipidica durante l'immersione iperossica [118]. Bosco et al. hanno osservato che i marcatori di stress ossidativo aumentano dopo l'immersione usando il rebreather a circuito chiuso (CCR) [119], probabilmente originati da un aumento della concentrazione di O₂ amplificata da variabili aggiuntive come l'esercizio fisico [120] e la resistenza respiratoria [121].

Le immersioni subacquee possono provocare un aumento del rilascio di microparticelle (MP) [122]. Il VGE rilasciato nella circolazione interagisce con l'endotelio, causando danni fisici con conseguente rilascio di MP, secondo l'attuale modello di DCS [123]. Il

VGE può ulteriormente esacerbare l'omeostasi endoteliale compromessa dall'ischemia-riperfusion, dal contatto fisico o dall'aumento dello stress da taglio [103], svolgendo un ruolo vitale nell'insorgenza della DCS [124-126]. Anche le MP svolgono un ruolo critico, poiché si è scoperto che aumentano insieme alla proteina-1 di adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM-1) durante l'iperossia (immersione simulata nelle camere iperbariche) [127] e dopo l'immersione [123]. Un alto valore circolante di VCAM-1 può riflettere una diminuzione della funzione endoteliale in correlazione con il danno cellulare [127]. La decompressione dopo l'immersione aumenta il tasso di formazione di MP insieme alle alterazioni dell'endotelio [123].

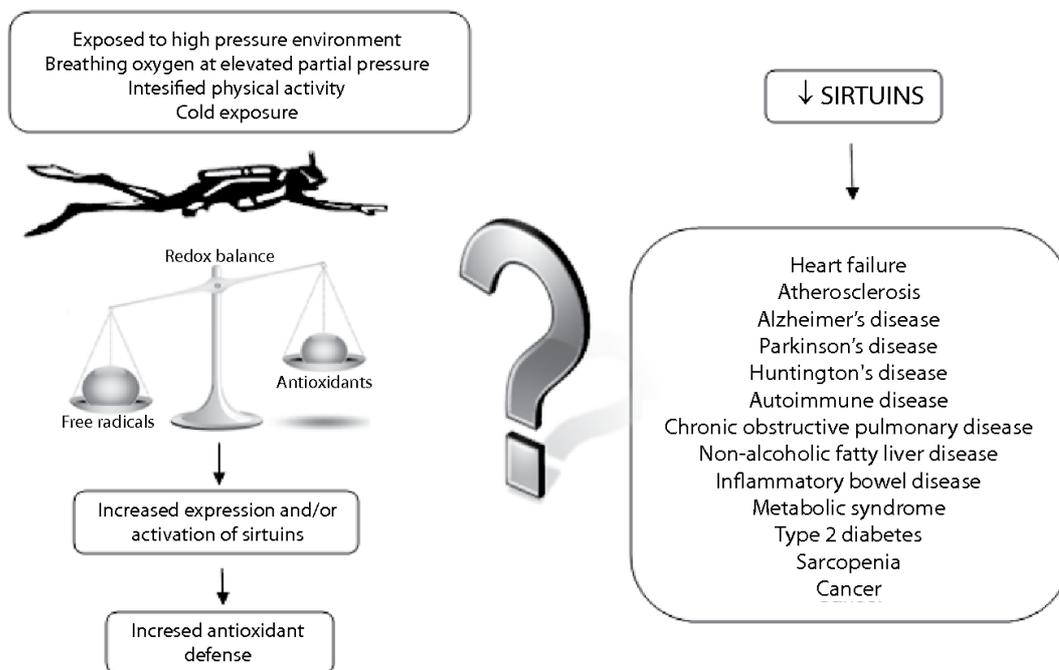


Figura 17: Quando si è esposti ad un ambiente ad alta pressione, si respira ossigeno ad alta pressione parziale, si sta svolgendo un'attività fisica intensa e si è esposti al freddo, viene aumentata l'espressione e l'attivazione delle sirtuine (classe di proteine ad attività enzimatica, che regolano importanti funzioni vitali) [128]

3.2 Un caso speciale: immersioni di saturazione

L'immersione di saturazione descrive un metodo di immersione che consente al subacqueo di rimanere sotto pressione per un lungo periodo (diverse ore o addirittura giorni). Nelle immersioni a terra, il subacqueo entra in acqua e scende sul fondo, dove rimane per un periodo limitato prima di tornare direttamente in superficie. Man mano che la pressione aumenta, il gas viene assorbito dal corpo in proporzione all'aumento della pressione ambientale. Questo gas in eccesso deve essere eliminato gradualmente durante il ritorno in superficie. I subacquei di saturazione sono esposti a condizioni ambientali gravi/estreme, esponendo i subacquei a rischi e incidenti più elevati [129].

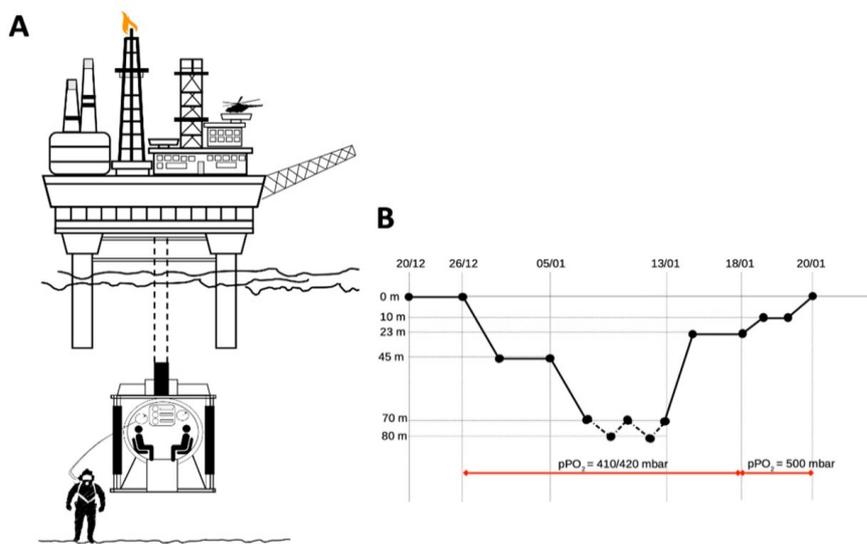


FIGURA 18: Progettazione dello studio sperimentale. In (A) la camera di alloggio; (B) profilo di immersione: i subacquei erano a bordo dal 20 al 26 dicembre, poi sono stati compressi a 45 m e vi hanno lavorato fino al 5 gennaio. Poi sono stati compressi a 70 m e hanno lavorato tra i 70 e gli 80 m per circa 8 giorni. Infine, i subacquei sono stati progressivamente decompressi in superficie (con una breve sosta a 23 m per un potenziale lavoro supplementare a quella profondità, non eseguito). [130]

La generazione di ROS può sovrappassare le difese antiossidanti [131] durante l'esposizione prolungata a un ambiente confinato, iperbarico e iperossico. Poiché l'iperossia, i cambiamenti parziali di pressione e lo scambio di gas inerti durante la decompressione sono probabili fonti di ROS in eccesso [132]. Bosco et al. hanno trovato un aumento dei biomarcatori correlati allo stress ossidativo, tra cui 8-deossiguanosina, 3-nitrotirosina e neopterina, a causa dell'esposizione prolungata a un valore di pO_2 più elevato [133]. Inoltre, i subacquei di saturazione mostrano concentrazioni elevate di IL-6, la prima

citochina rilasciata nella circolazione durante la risposta infiammatoria [134] e la creatinina in post-dive, che riflette l'effetto sistemico nelle immersioni di saturazione può essere dovuto a iperossia, pressioni iperbariche ed esercizio in profondità [133].

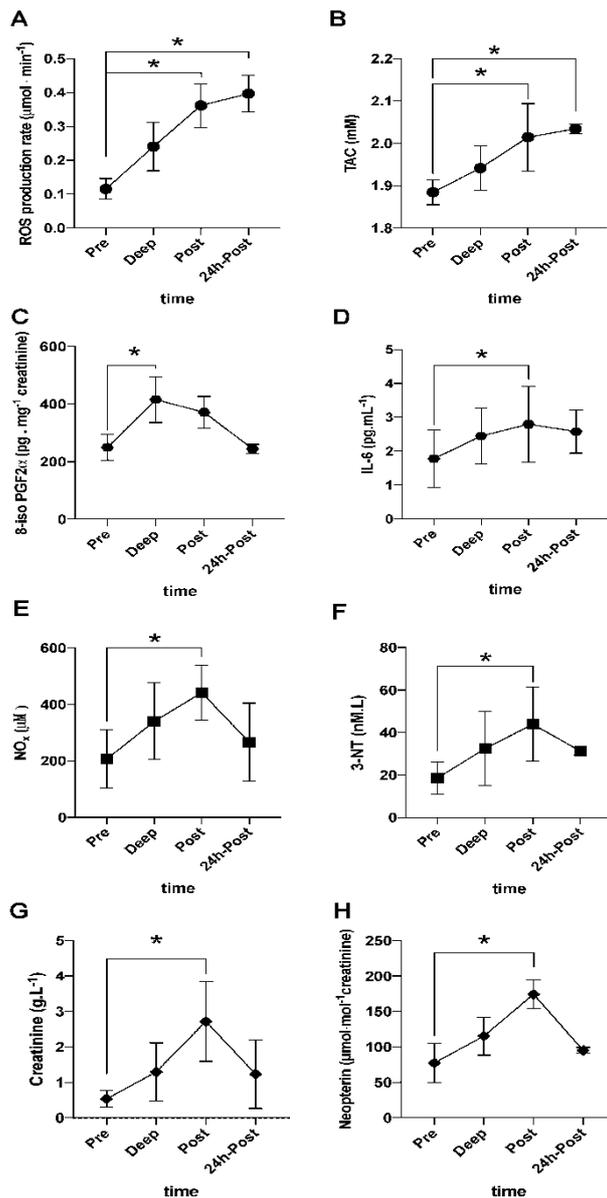


FIGURA 19: Biomarcatori cinetici durante l'immersione di saturazione. Corso temporale di: (A) tasso di produzione di ROS ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$) e (B) capacità antiossidante (TAC–mM) nella saliva calcolata mediante risonanza paramagnetica elettronica (EPR); (C) 8-isoprostano (8-iso-PGF2 α -pg \cdot mg $^{-1}$ creatinina); (D) interleuchina-6 (IL-6, pg \cdot mL $^{-1}$); (E) metaboliti dell'ossido nitrico (NO $_x$, μM) e (F) 3-nitrotirosina (3-NT, nM \cdot L $^{-1}$); (G) creatinina (g \cdot L $^{-1}$); (H) neottericina

($\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ creatinina), concentrazioni rilevate nelle urine. Tutti i campioni sono stati raccolti a pre-, a profondità, post- e 24 ore post-dive in immersione di saturazione. * $p < 0,05$. [135]

4. Conclusioni

In questo testo ho cercato di riportare le condizioni a cui si viene esposti facendo attività subacquee, con maggiore attenzione all'infiammazione derivata dai cambiamenti di concentrazione e di pressione dell'ossigeno nel corpo.

Gli effetti più rilevanti e più frequenti sono la produzione di ROS, derivanti da un eccesso di pO_2 con conseguente riduzione incompleta della molecola nella fosforilazione ossidativa.

Ci sono però delle differenze sostanziali se si parla di immersioni SCUBA (quindi con una riserva di ossigeno) o in apnea.

Nelle immersioni SCUBA si è principalmente esposti ad un aumento della pressione dei gas inspirati e quindi un aumento delle quantità di questi che vengono assorbiti a livello polmonare, da qui si può verificare la produzione di VGE (fenomeno a cui si può far fronte utilizzando miscele NITROX). Solo nelle immersioni in alta quota si è esposti anche ad ipossia.

Nelle immersioni in apnea si viene esposti ad un'alternanza di ipossia/iperossia, a seconda delle fasi dell'immersione: una forte iperossia nella fase di discesa iniziale con conseguente infiammazione provocata dall'eccesso di ROS, e ipossia nell'ultima fase della risalita che può portare a tensioni del sistema vascolare e alla disfunzione endoteliale (ma la probabilità di queste è molto bassa vista la poca esposizione ad ipossia).

Esiste un altro caso e sono le immersioni di saturazione, le quali prevedono che il subacqueo rimanga in profondità per diverse ore o addirittura giorni.

Non ci sono però solo effetti negativi, infatti il nostro organismo è in grado di adattarsi ai vari ambienti in cui si trova, ad esempio, durante le immersioni vengono attivati gli antiossidanti endogeni (come SOD, GPX e CAT) che proteggono dai danni di provocati dai radicali liberi che si generano.

Personalmente reputo che la subacquea sia una disciplina davvero affascinante, non solo per le sue potenzialità ricreative (come ammirare le infinite forme di vita presenti in laghi, fiumi e mari), ma anche perché permette di scoprire molti aspetti e capacità di adattamento che il corpo umano ha sviluppato nel corso della sua evoluzione, molti dei quali rimangono tuttora sconosciuti e in attesa di essere svelati.

Ringraziamenti di riconoscimento

Un ringraziamento speciale al Professore Gerardo Bosco e la Dott.ssa Simona Mrakic Sposta per l'aiuto nella stesura della tesi.

Ci tengo anche a ringraziare i miei genitori e mio zio per avermi insegnato fin da piccolo la passione per la subacquea.

Elenco delle abbreviazioni

4-HNE: 4-hydroxynonenal

8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deossiguanina

AA: amminoacidi

ATP: adenosina tri-fosfato

BH: breath-hold

CAT: catalasi

CCL: chemokine (C-C motif) ligand

CNS: sistema nervoso centrale

DCS: malattia da decompressione

EAN: aria arricchita nitrox

FiO₂: Frazione di ossigeno ispirato

FMD: dilatazione flusso-mediata

Gpx: glutatione perossidasi

•OH: radicale idrossile

H₂O₂: perossido di idrogeno

HIF: Fattore inducibile dall'ipossia

HO-1: heme ossigenasi-1

IH: ipossia intermittente

IL: interleuchina

LOOH: perossidi lipidici

MP: micro particelle

MAP: proteina attivata dal mitogeno

MIP-2: proteina-2 infiammatoria macrofagi

NAD⁺: nicotinamide adenina dinucleotide

NADPH: nicotinamide adenina dinucleotide fosfato

NF-κB: Fattore nucleare kappa-light-chain-enhancer delle cellule B attivate

NO: ossido nitrico

NOS: Ossido nitrico sintasi

eNOS: Ossido nitrico sintasi endoteliale

iNOS: Ossido nitrico sintasi inducibile

¹O₂: ossigeno singoletto

•O₂⁻: radicale superossido

•O₂²⁻: anione superossido

PI3: phosphoinositide-3

ONOO⁻: perossinitrito

pO₂: pressione parziale dell'ossigeno

ROO•: radicale perossido

RNS: Specie reattive dell'azoto

ROS: Specie reattive dell'ossigeno

SOD: superossido dismutasi

TAC: Capacità antiossidante totale

TGF-β: fattore di crescita trasformante beta

TNF- α : Fattore di necrosi tumorale alfa

VCAM-1: Proteina di adesione cellulare vascolare-1

VGE: Emboli di gas venoso

XO: Xanthine ossidasi

Riferimenti

1. Eisenberg, R. and H.B. Gray, *Preface on making oxygen*. Inorg Chem, 2008. **47**(6): p. 1697-9.
2. Knowles, J.R., *Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions*. Annu Rev Biochem, 1980. **49**: p. 877-919.
3. Magder, S., *Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?* Crit Care, 2006. **10**(1): p. 208.
4. Wilmshurst, P., *Diving and oxygen*. BMJ, 1998. **317**(7164): p. 996-9.
5. Eggers Jr, G.W.N. et al., *Hemodynamic responses to oxygen breathing in man*. J Appl Physiol 1962, **17**(1): p. 75-79.
6. Smerz, R.W., *Incidence of oxygen toxicity during the treatment of dysbarism*. Undersea Hyperb Med 2004, **31**(2): p. 199-202.
7. Clark, J.M. and C.J. Lambertsen, *Pulmonary oxygen toxicity: a review*. Pharmacol Rev 1971, **23**(2): p. 37-133.
8. Butler Jr, F.K., Hagan, C. and H. Murphy-Lavoie, *Hyperbaric oxygen therapy and the eye*. Undersea Hyperb Med 2008, **35**(5): p. 333-87.

9. Wingelaar, T.T., Van Ooij, P.A.M. and R.A. Van Hulst, *Oxygen Toxicity and Special Operations Forces Diving: Hidden and Dangerous*. Front Psychol 2017, **8**: p. 1263.
10. Clark, J.M. and S.R. Thom, *Oxygen under pressure*. In Bennett and Elliott's physiology and medicine of diving, Saunders Ltd Editor 2003: United States.
11. Forman, H.J., K.J. Davies, and F. Ursini, *How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 24-35.
12. Ursini, F., M. Maiorino, and H.J. Forman, *Redox homeostasis: The Golden Mean of healthy living*. Redox Biol, 2016. **8**: p. 205-15.
13. Hussain, S.P., L.J. Hofseth, and C.C. Harris, *Radical causes of cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(4): p. 276-85.
14. Ramos, P., et al., *effect of temperature and phase transition on the oxidation resistance of low-density lipoprotein*. J Lipid Res, 1995. **36**(10): p. 2113-28.
15. Liu, Z.Q., *Chemical methods to evaluate antioxidant ability*. Chem Rev, 2010. **110**(10): p. 5675-91.
16. Kalyanaraman, B., *Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 244-57.
17. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(13), 7273; <https://doi.org/10.3390/ijms23137273>.
18. Ignarro, L.J., et al., *Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview*. J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **34**(6): p. 879-86.
19. Ignarro, L.J., *Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology*. Biosci Rep, 1999. **19**(2): p. 51-71.
20. Chen, J., et al., *Excess no predisposes mitochondrial succinate-cytochrome c reductase to produce hydroxyl radical*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1807**(5): p. 491-502.
21. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 2002-12.

22. Rengasamy, A. and R.A. Johns, *Determination of Km for oxygen of nitric oxide synthase isoforms*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **276**(1): p. 30-3.
23. Hoehn, T., et al., *hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase-mediated cellular damage to the immature rat brain*. Pediatr Res, 2003. **54**(2): p. 179-84.
24. Sirinyan, M., et al., *Hyperoxic exposure leads to nitrative stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject*. Stroke, 2006. **37**(11): p. 2807-15.
25. Walling, C., *Fenton's reagent revisited*. Accounts of Chemical Research, 1975. **8**(4): p. 125-131.
26. Ursini, F., M. Maiorino, and C. Gregolin, *The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*. Biochim Biophys Acta, 1985. **839**(1): p. 62-70.
27. Saito, Y., et al., *Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p*. J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 2866-71.
28. Borgstahl, G.E., et al., *Human mitochondrial manganese superoxide dismutase polymorphic variant Ile58Thr reduces activity by destabilizing the tetrameric interface*. Biochemistry, 1996. **35**(14): p. 4287-97.
29. Bhabak, K.P. and G. Muges, *Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants*. Acc Chem Res, 2010. **43**(11): p. 1408-19.
30. Chelikani, P., I. Fita, and P.C. Loewen, *Diversity of structures and properties among catalases*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(2): p. 192-208.
31. Amorati, R. and L. Valgimigli, *Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants*. Free Radic Res, 2015. **49**(5): p. 633-49.
32. Ferrero-Miliani, L., et al., *Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(2): p. 227-35.
33. Calder, P.C., et al., *A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies*. Br J Nutr, 2013. **109** Suppl 1: p. S1-34.
34. Meeuwssen, S., et al., *Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to pro-inflammatory stimuli*. Glia, 2003. **43**(3): p. 243-53.

35. Mantovani, A., et al., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
36. Nanduri, J., et al., *Transcriptional responses to intermittent hypoxia*. Respir Physiol Neurobiol, 2008. **164**(1-2): p. 277-81.
37. Takada, Y., et al., *Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 24233-41.
38. Antioxidants 2021, 10(10), 1537; <https://doi.org/10.3390/antiox10101537>.
39. Cecchini, R. and A.L. Cecchini, *SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression*. Med Hypotheses, 2020. **143**: p. 110102.
40. Kominsky, D.J., E.L. Campbell, and S.P. Colgan, *Metabolic shifts in immunity and inflammation*. J Immunol, 2010. **184**(8): p. 4062-8.
41. Colgan, S.P. and C.T. Taylor, *Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(5): p. 281-7.
42. McGarry, T., et al., *Hypoxia, oxidative stress and inflammation*. Free Radic Biol Med, 2018. **125**: p. 15-24.
43. Bashir, S., et al., *Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis, 1993. **52**(9): p. 659-66.
44. Xiao, M., et al., *Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: Role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria*. Free Radic Biol Med, 2017. **111**: p. 316-327.
45. Aguilera-Aguirre, L., et al., *Innate inflammation induced by the 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-KRAS-NF-kappaB pathway*. J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4643-53.
46. Wruck, C.J., et al., *Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(5): p. 844-50.
47. Harris, A.J., et al., *HIF-mediated innate immune responses: cell signaling and therapeutic implications*. Hypoxia (Auckl), 2014. **2**: p. 47-58.
48. Semenza, G.L., *Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 97-106.

49. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5680-4.
50. Manalo, D.J., et al., *Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1*. Blood, 2005. **105**(2): p. 659-69.
51. Hu, C.J., et al., *Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(24): p. 9361-74.
52. Int J Med Sci 2024; 21(1):45-60. doi:10.7150/ijms.88216. <https://www.medsci.org/v21p0045.htm>).
53. Rybnikova, E.A., et al., *Intermittent Hypoxic Training as an Effective Tool for Increasing the Adaptive Potential, Endurance and Working Capacity of the Brain*. Front Neurosci, 2022. **16**: p. 941740.
54. (Front. Physiol., 20 September 2019, Sec. Integrative Physiology , Volume 10 - 2019 | <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01199>).
55. Cao, K.Y., et al., *Increased normoxic ventilation induced by repetitive hypoxia in conscious dogs*. J Appl Physiol (1985), 1992. **73**(5): p. 2083-8.
56. Rodriguez, F.A., et al., *Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity*. Med Sci Sports Exerc, 1999. **31**(2): p. 264-8.
57. Park, H.Y., et al., *Effects of Interval Training Under Hypoxia on Hematological Parameters, Hemodynamic Function, and Endurance Exercise Performance in Amateur Female Runners in Korea*. Front Physiol, 2022. **13**: p. 919008.
58. Zembron-Lacny, A., et al., *Intermittent Hypoxic Exposure Reduces Endothelial Dysfunction*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 6479630.
59. Verges, S., et al., *Hypoxic Conditioning as a New Therapeutic Modality*. Front Pediatr, 2015. **3**: p. 58.
60. Gore, C.J., S.A. Clark, and P.U. Saunders, *Non-hematological mechanisms of improved sea-level performance after hypoxic exposure*. Med Sci Sports Exerc, 2007. **39**(9): p. 1600-9.

61. Balestra, C., et al., *Hypoxic and Hyperoxic Breathing as a Complement to Low-Intensity Physical Exercise Programs: A Proof-of-Principle Study*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(17).
62. Debevec, T., et al., *Moderate exercise blunts oxidative stress induced by normobaric hypoxic confinement*. Med Sci Sports Exerc, 2014. **46**(1): p. 33-41.
63. Krzeszowiak, J., et al., *The influence of 9-day trekking in the Alps on the level of oxidative stress parameters and blood parameters in native lowlanders*. Ann Agric Environ Med, 2014. **21**(3): p. 585-9.
64. Morris, R., Berthold, R. and N. A. Cabrol, *Diving at Extreme Altitude: Dive Planning and Execution During the 2006 High Lakes Science Expedition.*, in *Proceedings of the American Academy of Underwater Sciences (AAUS), Twenty-sixth annual Scientific Diving Symposium University of Miami, Miami, FL.*, N.W. Pollock and J.M. Godfrey (Eds.), Editor 2007, American Academy of Underwater Sciences (AAUS): Miami (USA).
65. Bell, R.L. and R.E. Borgwardt, *The theory of high-altitude corrections to the US Navy standard decompression tables. The cross corrections*. Undersea Biomed Res, 1976. **3**(1): p. 1-23.
66. Brubakk, A.O., Neuman, T. S. , *Bennett and Elliott's physiology and medicine of diving*. 5 ed2003, USA.
67. Department, N., *US Navy Diving Manual. Revision 7. Vol 5: Diving Medicine and Recompression Chamber Operations. NAVSEA 0910-LP-115-1921. Washington, DC: Naval Sea Systems Command, 2016.*
68. Paulev, P.E. and G. Zubieta-Calleja, *High altitude diving depths*. Res Sports Med, 2007. **15**(3): p. 213-23.
69. Robins, M. and H.M. Murphy-Lavoie, *Diving at Altitude*, in *StatPearls2023: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Heather Murphy-Lavoie declares no relevant financial relationships with ineligible companies.*
70. Bosco, G., et al., *Environmental stress on diving-induced platelet activation*. Undersea Hyperb Med, 2001. **28**(4): p. 207-11.

71. Sureda, A., et al., *Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage*. *Med Sci Sports Exerc*, 2009. **41**(6): p. 1271-6.
72. Khatun, S., et al., *Induction of hypercoagulability condition by chronic localized cold stress in rabbits*. *Thromb Haemost*, 1999. **81**(3): p. 449-55.
73. Heusser, K., et al., *Cardiovascular regulation during apnea in elite divers*. *Hypertension*, 2009. **53**(4): p. 719-24.
74. Bosco, G., et al., *Environmental Physiology and Diving Medicine*. *Front Psychol*, 2018. **9**: p. 72.
75. Muth, C.M., et al., *Arterial blood gases during diving in elite apnea divers*. *Int J Sports Med*, 2003. **24**(2): p. 104-7.
76. Theunissen, S., et al., *Nitric oxide-related endothelial changes in breath-hold and scuba divers*. *Undersea Hyperb Med*, 2013. **40**(2): p. 135-44.
77. Theunissen, S., et al., *Dark chocolate reduces endothelial dysfunction after successive breath-hold dives in cool water*. *Eur J Appl Physiol*, 2013. **113**(12): p. 2967-75.
78. Ottolenghi, S., et al., *hyperoxia and oxidative stress in anesthesia and critical care medicine*. *Minerva Anesthesiol*, 2020. **86**(1): p. 64-75.
79. Theunissen, S., et al., *Oxidative stress in breath-hold divers after repetitive dives*. *Diving Hyperb Med*, 2013. **43**(2): p. 63-6.
80. Cialoni, D., et al., *Nitric Oxide and Oxidative Stress Changes at Depth in Breath-Hold Diving*. *Front Physiol*, 2020. **11**: p. 609642.
81. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(10): p. 840-4.
82. Mrakic-Sposta, S., et al., *Oxidative stress assessment in breath-hold diving*. *Eur J Appl Physiol*, 2019. **119**(11-12): p. 2449-2456.
83. Data, P.G., et al., *Change in plasma amino acid concentrations during breath-hold diving at high altitude*. *Clin Physiol Biochem*, 1988. **6**(6): p. 327-33.
84. Cialoni, D., et al., *Serum Amino Acid Profile Changes After Repetitive Breath-Hold Dives: A Preliminary Study*. *Sports Med Open*, 2022. **8**(1): p. 80.

85. Zaccaria, M., et al., *Effects of high-altitude chronic hypoxia on platelet alpha 2-receptors in man*. Eur J Clin Invest, 1997. **27**(4): p. 316-21.
86. Goebel, M.U., et al., *Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production after acute psychological stress, exercise, and infused isoproterenol: differential effects and pathways*. Psychosom Med, 2000. **62**(4): p. 591-8.
87. Kurose, I., et al., *Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage*. Circ Res, 1994. **74**(2): p. 336-43.
88. Lievens, D., et al., *Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis*. Blood, 2010. **116**(20): p. 4317-27.
89. Ando, Y., T. Oku, and T. Tsuji, *Platelets attenuate production of cytokines and nitric oxide by macrophages in response to bacterial endotoxin*. Platelets, 2016. **27**(4): p. 344-50.
90. Gudbrandsdottir, S., H.C. Hasselbalch, and C.H. Nielsen, *Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF-alpha secretion by monocytes*. J Immunol,
91. Damiani, E., A. Donati, and M. Girardis, *Oxygen in the critically ill: friend or foe?* Curr Opin Anaesthesiol, 2018. **31**(2): p. 129-135.
92. Jamieson, D., et al., *The relation of free radical production to hyperoxia*. Annu Rev Physiol, 1986. **48**: p. 703-19.
93. Qadan, M., et al., *oxygen and surgical site infection: a study of underlying immunologic mechanisms*. Anesthesiology, 2010. **113**(2): p. 369-77.
94. McInturff, A.M., et al., *Mammalian target of rapamycin regulates neutrophil extracellular trap formation via induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha*. Blood, 2012. **120**(15): p. 3118-25.
95. O'Reilly, P.J., et al., *hyperoxia impairs antibacterial function of macrophages through effects on actin*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **28**(4): p. 443-50.
96. Hou, L., et al., *100% oxygen inhalation protects against zymosan-induced sterile sepsis in mice: the roles of inflammatory cytokines and antioxidant enzymes*. Shock, 2009. **32**(4): p. 451-61.

97. Zhang, Z., et al., *activation of cholinergic anti-inflammatory pathway contributes to the protective effects of 100% oxygen inhalation on zymosan-induced generalized inflammation in mice*. J Surg Res, 2012. **174**(2): p. e75-83.
98. Jackson, R.M., *Pulmonary oxygen toxicity*. Chest, 1985. **88**(6): p. 900-5.
99. Bhandari, V., *Molecular mechanisms of hyperoxia-induced acute lung injury*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 6653-61.
100. Li, LF, et al., *Low-molecular-weight heparin reduces hyperoxia-augmented ventilator-induced lung injury via serine/threonine kinase-protein kinase B*. Respir Res, 2011. **12**(1): p. 90.
101. Entezari, M., et al., *Inhibition of extracellular HMGB1 attenuates hyperoxia-induced inflammatory acute lung injury*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 314-22.
102. Brubakk, A.O., et al., *A single air dive reduces arterial endothelial function in man*. J Physiol, 2005. **566**(Pt 3): p. 901-6.
103. Obad, A., et al., *Successive deep dives impair endothelial function and enhance oxidative stress in man*. Clin Physiol Funct Imaging, 2010. **30**(6): p. 432-8.
104. Sureda, A., et al., *Scuba diving activates vascular antioxidant system*. Int J Sports Med, 2012. **33**(7): p. 531-6.
105. Bosco, G., et al., *effect of in-water oxygen prebreathing at different depths on decompression-induced bubble formation and platelet activation*. J Appl Physiol (1985), 2010. **108**(5): p. 1077-83.
106. Ferrer, M.D., et al., *Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils*. Free Radic Res, 2007. **41**(3): p. 274-81.
107. Perovic, A., et al., *effect of scuba diving on the oxidant/antioxidant status, SIRT1 and SIRT3 expression in recreational divers after a winter nondive period*. Free Radic Res, 2018. **52**(2): p. 188-197.
108. Faraci, F.M. and S.P. Didion, *Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1367-73.
109. Cialoni, D., et al., *Altered Venous Blood Nitric Oxide Levels at Depth and Related Bubble Formation During Scuba Diving*. Front Physiol, 2019. **10**: p. 57.

110. Ersoz, G., et al., *Platelet aggregation and release function in hyperbaric oxygenation*. Undersea Hyperb Med, 1998. **25**(4): p. 229-32.
111. Hjelde, A., et al., *Complement activation in divers after repeated air/heliox dives and its possible relevance to DCS*. J Appl Physiol (1985), 1995. **78**(3): p. 1140-4.
112. Morabito, C., et al., *effect of pre-breathing oxygen at different depth on oxidative status and calcium concentration in lymphocytes of scuba divers*. Acta Physiol (Oxf), 2011. **202**(1): p. 69-78.
113. Eckmann, D.M. and S.C. Armstead, *Influence of endothelial glycocalyx degradation and surfactants on air embolism adhesion*. Anesthesiology, 2006. **105**(6): p. 1220-7.
114. Philp, R.B., M.J. Inwood, and BA. Warren, *Interactions between gas bubbles and components of the blood: implications in decompression sickness*. Aerosp Med, 1972. **43**(9): p. 946-53.
115. Philp, R.B., P. Schacham, and C.W. Gowdey, *Involvement of platelets and microthrombi in experimental decompression sickness: similarities with disseminated intravascular coagulation*. Aerosp Med, 1971. **42**(5): p. 494-502.
116. Kuroiwa, K., *The functional and biochemical changes of platelets in experimental decompression sickness of rabbits*. Bull Tokyo Med Dent Univ, 1984. **31**(2): p. 73-84.
117. Baj, Z., et al., *The effect of air and nitrox divers on platelet activation tested by flow cytometry*. Aviat Space Environ Med, 2000. **71**(9): p. 925-8.
118. Bosco, G., et al., *Effects of the Ketogenic diet in overweight divers breathing Enriched Air Nitrox*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 2655.
119. Bosco, G., et al., *Spirometry and oxidative stress after rebreather diving in warm water*. Undersea Hyperb Med, 2018. **45**(2): p. 191-198.
120. Gronow, G., et al., *Benzoate hydroxylation: a measure of oxidative stress in divers*. Adv Exp Med Biol, 2005. **566**: p. 223-9.
121. Doubt, TJ, *Cardiovascular and thermal responses to SCUBA diving*. Med Sci Sports Exerc, 1996. **28**(5): p. 581-6.

122. Freyssinet, J.M., *Cellular microparticles: what are they bad or good for?* J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1655-62.
123. Madden, LA, et al., *Endothelial function and stress response after simulated dives to 18 msw breathing air or oxygen.* Aviat Space Environ Med, 2010. **81**(1): p. 41-5.
124. Nossum, V., A. Hjelde, and A.O. Brubakk, *Small amounts of venous gas embolism cause delayed impairment of endothelial function and increase polymorphonuclear neutrophil infiltration.* Eur J Appl Physiol, 2002. **86**(3): p. 209-14.
125. Valic, Z., et al., *Diving-induced venous gas emboli do not increase pulmonary artery pressure.* Int J Sports Med, 2005. **26**(8): p. 626-31.
126. Cialoni, D., et al., *Dive Risk Factors, Gas Bubble Formation, and Decompression Illness in Recreational SCUBA Diving: Analysis of DAN Europe DSL Data Base.* Front Psychol, 2017. **8**: p. 1587.
127. Vince, R.V., et al., *Release of VCAM-1 associated endothelial microparticles following simulated SCUBA dives.* Eur J Appl Physiol, 2009. **105**(4): p. 507-13.
128. DOI:10.11613/BM.2014.026Corpus ID: 7232988).
129. Beyerstein G., Lang M. A., and S. N.E. *Commercial Diving: Surface-Mixed Gas, Sur-D-O₂, Bell Bounce, Saturation.* in *Proceedings of the Advanced Scientific Diving Workshop.* 2006. Smithsonian Institution, Washington, DC, USA.
130. Int. J. Environ. Res. Public Health 2020, 17(19), 7118; <https://doi.org/10.3390/ijerph17197118>.
131. Copley, JN, et al., *Influence of vitamin C and vitamin E on redox signaling: Implications for exercise adaptations.* Free Radic Biol Med, 2015. **84**: p. 65-76.
132. Brubakk, A.O., J.A. Ross, and S.R. Thom, *Saturation diving; physiology and pathophysiology.* Compr Physiol, 2014. **4**(3): p. 1229-72.
133. Mrakic-Spota, S., et al., *Change in Oxidative Stress Biomarkers During 30 Days in Saturation Dive: A Pilot Study.* Int J Environ Res Public Health, 2020. **17**(19).
134. Sureda, A. et al., *Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils.* Physiol Genomics, 2014. **46**(17): p. 647-54.

135. Int. J. Environ. Res. Public Health 2020, 17(19), 7118;
<https://doi.org/10.3390/ijerph17197118>.