

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNICHE
DELL'ATTIVITÀ MOTORIA PREVENTIVA E ADATTATA**

TESI DI LAUREA

**Effetti dell'esposizione ipossica-iperossica
intermittente in atleti e contesti specifici**

Relatore: Prof. Gerardo Bosco

Correlatore: Dr. Tommaso Antonio Giacon

Laureando: Bortolato Margherita

Anno Accademico 2023/2024

Abstract

Presupposti dello studio:

L'allenamento intermittente ipossico-iperossico (IHHT) è una tecnica emergente utilizzata per ottimizzare la performance fisica, migliorare la resistenza e accelerare il recupero post-esercizio. Recenti studi hanno evidenziato come questa metodologia possa essere applicata non solo in ambito sportivo, ma anche in contesti estremi come l'alpinismo, le immersioni subacquee e i voli spaziali.

Scopo dello studio:

Questo studio ha lo scopo di valutare gli effetti dell'esposizione intermittente a miscele ipo- e iperossiche su atleti sani, con particolare attenzione ai benefici metabolici, neuroprotettivi e antinfiammatori.

Materiali e Metodi:

Un gruppo di 12 volontari, suddivisi in due gruppi, ha partecipato a un protocollo di training su treadmill. Gli atleti sono stati sottoposti a 8 sessioni di esposizione a miscele ipo- e iperossiche per 4 settimane, utilizzando il dispositivo OX2 Master®. I parametri vitali sono stati misurati in ogni sessione, inoltre sono stati raccolti campioni di sangue, urine e saliva da cui sono stati dosati lo stress ossidativo, l'infiammazione (ROS, IL-6, TAC e funzionalità renale)

Risultati:

I dati raccolti hanno dimostrato che l'IHHT induce una risposta ossidativa anche a bassi dosaggi con adattamento. Inoltre, si è osservato un miglioramento di percezione soggettiva in termini prestativi nei soggetti (BORG scale). L'adattamento ai sintomi di ipossia, benchè blandi, si è massimizzato dal terzo allenamento. Non si sono verificate sintomatologie ipossiche maggiori, dimostrando la sicurezza del protocollo.

Conclusioni:

Questo studio conferma la sicurezza e l'efficacia dell'esposizione intermittente a miscele ipo-iperossiche per migliorare la prestazione atletica e favorire il recupero. I risultati suggeriscono che l'IHHT, se dosato correttamente, rappresenta una strategia sicura ed

efficace non solo per gli atleti, ma anche per individui esposti a condizioni ambientali estreme.

Abstract

Background:

Intermittent Hypoxic-Hyperoxic Training (IHHT) is an emerging technique utilized to optimize physical performance, enhance endurance, and accelerate post-exercise recovery. Recent studies have highlighted its applicability not only in sports but also in extreme contexts such as mountaineering, scuba diving, and space flights.

Purpose of the study:

This study aims to evaluate the effects of intermittent exposure to hypoxic and hyperoxic mixtures on healthy athletes, with a particular focus on metabolic, neuroprotective, and anti-inflammatory benefits.

Materials and Methods:

A group of 12 volunteers, divided into two groups, participated in a treadmill training protocol. Athletes underwent 8 sessions of exposure to hypoxic and hyperoxic mixtures over 4 weeks, utilizing the OX2 Master® device. Vital parameters were measured in each session, and blood, urine, and saliva samples were collected to assess oxidative stress, inflammation (ROS, IL-6, TAC), and renal function.

Results:

The collected data demonstrated that IHHT induces an oxidative response even at low dosages with adaptation. Furthermore, a subjective improvement in performance perception was noted in participants (BORG scale). Adaptation to hypoxia symptoms, although mild, peaked after the third training session. No major hypoxic symptoms were observed, confirming the safety of the protocol.

Conclusions:

This study confirms the safety and efficacy of intermittent exposure to hypoxic-hyperoxic mixtures for enhancing athletic performance and promoting recovery. The results suggest

that IHHT, when properly dosed, represents a safe and effective strategy not only for athletes but also for individuals exposed to extreme environmental conditions.

Indice

Introduzione	1
La pathway dell'ossigeno	2
L'Ipossia (HIF, NfKb, adattamento all'ipossia)	4
L'Ipossia intermittente	7
L'iperossia (ROS, TAC,)	10
L'Iperossia intermittente	12
L'esposizione ipossica/iperossica in soggetti sportivi	12
Training ipossico/iperossico	14
Potenziali campi di utilizzo futuri e applicazioni nella performance	15
Contesti specifici: subacquei, alpinisti, piloti, sottomarini, astronauti	15
Precedenti esperienze	17
Materiali e metodi	19
Disegno sperimentale	19
Soggetti	22
Biomarkers	22
Analisi dei campioni	24
Risultati	25
Statistica	25
Sicurezza	25
Carico di Lavoro	25
Stress ossidativo e infiammazione	26
Pathway NO	27

Funzione renale e risposta immunitaria	29
Esami ematochimici	30
Discussione	32
Conclusione	34
Bibliografia	35

Introduzione

L'allenamento ipossico-iperossico intermittente (IHHT – Intermittent Hypoxic Hyperoxic Training) rappresenta una delle metodologie emergenti più promettenti nel campo della scienza dello sport e della medicina applicata. Basata sull'alternanza di brevi periodi di esposizione a condizioni ipossiche (ridotta concentrazione di ossigeno) e iperossiche (elevata concentrazione di ossigeno), questa forma di training mira a stimolare adattamenti fisiologici complessi capaci di ottimizzare le prestazioni fisiche, migliorare la resistenza all'esercizio e accelerare i processi di recupero post-allenamento. Negli ultimi anni, l'interesse scientifico verso l'IHHT è cresciuto significativamente, supportato da un crescente numero di studi che ne investigano i meccanismi di azione a livello cellulare e molecolare. (1)

A livello scientifico, l'IHHT si colloca all'incrocio di numerose aree di ricerca, quali la fisiologia dell'esercizio, la biochimica dell'ossigeno e la medicina riabilitativa. La letteratura attuale ha messo in luce come l'alternanza tra ipossia e iperossia attivi risposte cellulari uniche, tra cui la stabilizzazione dei fattori inducibili dall'ipossia (HIF-1 α), responsabili dell'incremento dell'eritropoiesi, dell'angiogenesi e della capacità di utilizzo del glucosio a livello cellulare. (2) Allo stesso tempo, l'esposizione all'iperossia stimola una produzione controllata di specie reattive dell'ossigeno (ROS), fondamentali per attivare le vie di segnalazione antiossidanti e antinfiammatorie che promuovono la rigenerazione e il miglioramento delle capacità metaboliche. Questo equilibrio tra stress ossidativo e adattamento cellulare ha reso l'IHHT un campo di ricerca particolarmente rilevante per il miglioramento della performance sportiva e della salute metabolica. (3)

Nell'ambito sportivo, l'IHHT ha trovato applicazione tra atleti d'élite, specialmente in sport di endurance come ciclismo e corsa. Questa tecnica è usata per migliorare la capacità aerobica e anaerobica senza la necessità di recarsi in altitudine, rendendola una strategia accessibile e pratica per potenziare la performance. I benefici includono un miglioramento della soglia del lattato e una maggiore ossigenazione dei muscoli durante l'esercizio. (4)

In contesti specifici, invece, come quello degli astronauti e dei sottomarini, l'IHHT viene studiato come metodo per migliorare l'adattamento a condizioni estreme, come le rapide variazioni di ossigeno o pressione, che mettono a dura prova l'organismo. Gli studi in

questi ambiti mirano a preservare la salute fisica e mentale durante esposizioni prolungate a condizioni avverse, ottimizzando la tolleranza e la capacità di adattamento del corpo. (5)

In sintesi, l'IHHT rappresenta una metodologia innovativa che, pur essendo relativamente recente, ha già dimostrato il suo potenziale in una vasta gamma di contesti, dalla preparazione atletica d'élite alla gestione delle condizioni estreme affrontate da astronauti, sottomarini e piloti. Tuttavia, mentre gli studi iniziali sono promettenti, ulteriori ricerche sono necessarie per ottimizzare i protocolli di esposizione e per comprendere appieno i meccanismi sottostanti che rendono questo approccio così efficace e versatile. (6)

In questo studio viene riportato il progetto sperimentale che riguarda per l'appunto la somministrazione di un protocollo di esercizio fisico IHHT in soggetti sani, per lo più atleti di endurance, sottoposti a differenti dosaggi di ossigeno. Vengono investigati differenti parametri per confermare quanto già riportato in letteratura riguardo al IHHT e fornire ulteriori evidenze dell'efficacia di questa metodologia di allenamento.

La pathway dell'ossigeno

L'ossigeno (O₂) è una molecola essenziale per la sopravvivenza dell'essere umano e l'esplicazione delle sue funzioni vitali fondamentali. Il suo continuo apporto è infatti necessario per il mantenimento dello stato di salute cellulare attraverso le basilari attività metaboliche. L'ossigeno è utilizzato dal nostro organismo come accettore finale di elettroni nella catena respiratoria nel processo di respirazione cellulare per la produzione di ATP a livello mitocondriale, la via energetica più efficiente di cui disponiamo. (7)

Negli organismi aerobi, come l'uomo, il trasporto dell'ossigeno avviene mediante l'azione di proteine coniugate a metalli, che legano atomi di O₂ e li trasportano in tutti i distretti corporei, dove questa molecola viene rilasciata e utilizzata a livello tissutale. Questi cosiddetti "pigmenti respiratori" come Emoglobina (Hb) e Mioglobina (Mb), sono due sistemi ottimali, rispettivamente, di trasporto attraverso il circolo ematico e di immagazzinamento di O₂ nei tessuti muscolari. Le funzioni e il grado di saturazione (intesa come percentuale di molecola legata ad ossigeno sul totale) di Hb e Mb sono regolate prevalentemente da: pressione parziale dell'O₂ (P_{O₂}) ambientale, interfaccia

alveolo/arteriosa e scambio a livello polmonare, stato emodinamico, legame di altre molecole con Hb (CO).

Il trasporto di ossigeno viene descritto in Fisiologia dalla seguente formula, in cui DO₂ (Delivery di O₂) valuta la disponibilità (apporto) di ossigeno che corrisponde alla gittata cardiaca x contenuto arterioso di ossigeno (CaO₂). La gittata cardiaca è uguale alla gittata sistolica x frequenza cardiaca mentre la CaO₂ è uguale a: (Hb x Sat. O₂ x 1,39) + (PaO₂ x 0,003). In cui i due valori corrispondono rispettivamente alla capacità dell'emoglobina di legare l'ossigeno e l'ammontare di ossigeno disciolto nel circolo ematico.

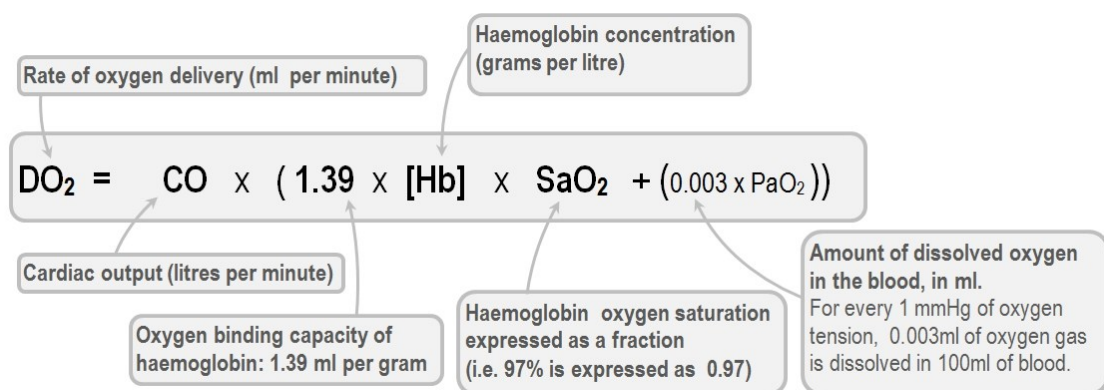


Figura 1. Rate of Oxygen Delivery. (8)

Secondo quanto descritto da questa formula, infatti, senza una buona gittata cardiaca, l'ossigeno contenuto a livello circolatorio, non riuscirebbe a raggiungere adeguatamente i tessuti.

Un altro parametro spesso utilizzato per descrivere il trasporto dell'ossigeno all'interno del nostro organismo è il VO₂, che rappresenta la quantità di O₂ che il corpo può utilizzare durante l'esercizio fisico. È un indicatore importante che rappresenta la capacità dell'individuo di compiere uno sforzo aerobico, associato alla performance cardiovascolare e alla resistenza. Il meccanismo alla base del VO₂ è correlato alla formula di Fick, che descrive come l'ossigeno venga trasportato dal sangue ai tessuti, e calcola anche il consumo di ossigeno del corpo.

$$VO_2 = Q \times (C(a-v)O_2)$$

Dove:

- Q rappresenta la portata cardiaca, ovvero la quantità di sangue pompata al minuto dal cuore. È il prodotto di frequenza cardiaca (HR) e volume sistolico (SV)
- $C(a-v)O_2$ rappresenta la differenza artero-venosa di ossigeno che descrive la quantità di ossigeno estratta dai tessuti. (9)

L'Ipossia

Lo stato ipossico si verifica quando la disponibilità a livello tissutale di ossigeno non ne soddisfa la richiesta ($VO_2 > DO_2$. In questo caso aumenta Oxygen extraction dei tessuti fino al massimo possibile ed i tessuti sensibili all'ipossia, quelli più dipendenti dal metabolismo ossidativo, iniziano a soffrire); a causa di bassi livelli di pressione parziale di ossigeno inspirato (pO_2), bassa concentrazione di ossigeno nell'aria inspirata (FiO_2) o ancora a causa di un'insufficiente ossigenazione tissutale legata ad alterazioni nel trasporto (DO_2) che comprendono tutti i disordini respiratori, circolatori ed ematologici. (10)

L'ipossia induce nell'organismo diverse risposte, tra cui alterazioni del metabolismo lipidico, della permeabilità dei canali ionici e dei modelli di modificazione post-trascrizionale, come la fosforilazione delle proteine (11). Oltre a ciò, si sviluppano reazioni a livello trascrizionale, dipendenti dalla disponibilità di ossigeno.

Le prime risposte sono, in realtà, uno shift del metabolismo, in precedenza aerobico, verso una forma anaerobica, con conseguente riduzione dell'efficienza metabolica (2 moli di ATP in glicolisi anaerobica vs 38 mol. in aerobiosi per moli di glucosio) e produzione di scarti del metabolismo, quali i lattati.

Per sforzi prolungati, con disponibilità di ossigeno, il nostro organismo utilizza preferenzialmente metabolismi aerobici come la glicolisi aerobica, il ciclo dell'acido citrico, la catena di trasporto degli elettroni e la fosforilazione ossidativa, la beta-ossidazione degli acidi grassi. In condizioni di mancanza di ossigeno, invece, l'organismo utilizza meccanismi alternativi di produzione di energia come la glicolisi anerobica, in cui il glucosio viene convertito in acido piruvico senza utilizzo di ossigeno, con

produzione di acido lattico (che può causare affaticamento muscolare) e una resa in termini di ATP molto minore rispetto allo stesso meccanismo in forma aerobica. In casi estremi di ipossia prolungata, il corpo può ossidare gli acidi grassi con una produzione inefficiente di ATP. (12)

Queste modifiche metaboliche conseguenti allo stato ipossico influenzano l'equilibrio redox, processo di ossidoriduzione fondamentale nell'organismo per mantenere l'omeostasi cellulare e che va a regolare numerosi processi biologici, come la produzione energetica e la risposta allo stress ossidativo. (13)

In condizione di ridotta disponibilità di ossigeno si verifica un aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) causato da una disfunzione mitocondriale conseguente allo stato ipossico, stimolando una risposta adattativa che comprende l'attivazione di percorsi di segnalazione che includono il fattore HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 alpha). (14)

Se l'equilibrio redox è compromesso e il sistema antiossidante non riesce a neutralizzare l'eccesso di ROS, può verificarsi un danno ossidativo tale da condurre a disfunzione cellulare, apoptosi o necrosi.

Questi squilibri vengono meno con l'esposizione prolungata allo stato ipossico, in cui l'organismo può adattarsi per migliorare la gestione dell'equilibrio redox attraverso: un aumento della capacità antiossidante totale (TAC) del sistema tampone per contrastare l'aumento di ROS, uno stimolo alla formazione di nuovi vasi sanguigni per ridurre lo stress ossidativo, un aumento della plasticità metabolica per adattare l'organismo a utilizzare diversi substrati energetici per operare in condizioni di bassa disponibilità di ossigeno senza accumulare eccessive ROS. (15)

Le risposte trascrizionali all'ipossia sono molteplici, e mirano alla conservazione delle funzioni cellulari più a lungo ed in modo più efficiente possibile pur in condizioni sfavorevoli. La cascata di reazioni ha a monte un fattore di trascrizione detto Hypoxia Inducible Factor 1- α (HIF1 α) che si accumula nelle cellule in risposta a bassi livelli di ossigeno e attiva la trascrizione di diversi geni coinvolti nel metabolismo dell'energia, nell'angiogenesi, nella produzione di globuli rossi, e in molti altri processi che permettono alle cellule di sopravvivere in condizioni di ipossia. Questa scoperta ha valso il Premio

Nobel per la Fisiologia o Medicina nel 2019, assegnato congiuntamente a William G. Kaelin Jr., Sir Peter J. Ratcliffe e Gregg L. Semenza per le loro scoperte su come le cellule percepiscono e si adattano alla disponibilità di ossigeno. (16, 17)

I geni attivati dai fattori inducibili dall'ipossia (HIF) aumentano la capacità del sangue di trasportare ossigeno tramite l'eritropoiesi, la consegna di ossigeno ai tessuti (rimodellamento vascolare) e la produzione di ATP indipendente dall'ossigeno (trasporto del glucosio e glicolisi) (18). Il controllo trascrizionale di questi geni è modulato da risposte infiammatorie legate allo stato ipossico e altri stressors, attivati dal fattore nucleare-kB (NF-kB).

Conseguentemente all'ipossia e alla cascata di segnali che questo stimolo comporta, le subunità α degli HIF formano eterodimeri con le subunità β degli HIF per formare eterodimeri HIF che controllano trascrizionalmente un ampio programma genico. La regolazione genica sovrapposta di HIF-1 e HIF-2 regola l'angiogenesi, il metabolismo lipidico e l'immunità (19, 20).

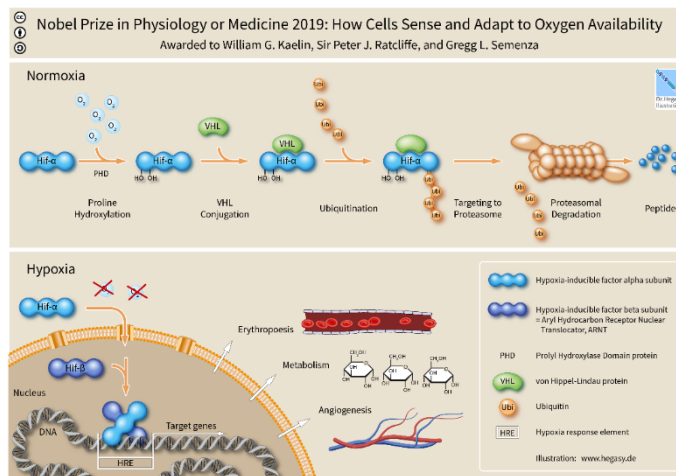


Figura 2. Tratto da: Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019: How Cells Sense and Adapt to Oxygen Availability. In condizioni normossiche, Hif-1 alfa è idrossilato a due residui di prolina. La proteina si associa quindi alla VHL e viene successivamente marcata con l'ubiquitina. L'Hif-1 alfa viene quindi traslocato nel proteasoma, dove viene degradato. In condizioni di ipossia, non è disponibile ossigeno per l'idrossilazione della prolina. In questa situazione Hif-1 alfa trasloca nel nucleo cellulare e si associa con Hif-1 beta, chiamato anche ARNT. Questo complesso si lega quindi a una regione del DNA

chiamata HRE (elemento sensibile all'ipossia). Di conseguenza, i geni bersaglio vengono trascritti. Questi geni sono coinvolti nella regolazione di una moltitudine di processi, tra cui l'eritropoesi, la glicolisi e l'angiogenesi. (21)

La segnalazione di HIF e NF-kB dipende dall'intensità e dalla durata dello stimolo ipossico e può attenuare (22) o intensificare le risposte infiammatorie (23).

I meccanismi molecolari conducono alla sensazione di mancanza di ossigeno sistemica, portando a risposte dirette all'ipossia. La risposta ventilatoria all'ipossia (HVR) aumenta la ventilazione alveolare per compensare la riduzione della PO₂ inspiratoria (24, 25). Questo comporta degli adattamenti del ritmo respiratorio, attività di muscoli respiratori, pressione sanguigna e frequenza cardiaca, concentrazione di lattato (26).

Con la riduzione della pressione arteriosa di ossigeno (PaO₂) e conseguentemente della saturazione dell'emoglobina (SaO₂), abbiamo un adattamento fisiologico dell'organismo all'ipossia. Questo adattamento è promosso in prima battuta dalla stabilizzazione dei fattori inducibili dall'ipossia (HIF), che sono i principali sistemi di percezione e regolazione dell'omeostasi dell'ossigeno (27). In risposta si verifica quindi una iperespressione di geni responsabili dell'eritropoesi, dell'angiogenesi e adattamenti metabolici, che si concretizzano in una sopravvivenza dell'individuo anche in condizioni ostili con un adattamento a breve, medio o lungo termine. (28, 29)

A livello di soggetti sani si verifica un aumento delle prestazioni fisiche dopo un'esposizione prolungata all'ipossia ipobarica (bassa pressione atmosferica legata all'altitudine) o normobarica. Questo effetto ha portato alla ricerca dell'esposizione ottimale all'ipossia per il miglioramento della performance. (30)

L'Ipossia intermittente

Anche chiamata ipossia ciclica o episodica, l'ipossia intermittente (IH) è l'alternanza di stati ipossici a stati normossici.

L'ipossia sistemica può essere generata in due modi: riducendo la pressione barometrica (pO_2), o riducendo la frazione di O_2 nell'aria ispirata (FiO_2). Entrambe vanno a generare una diminuzione della PaO_2 e di conseguenza della SaO_2 , andando a generare la cascata di segnali trascrizionali e metabolici visti precedentemente. (31)

Il condizionamento ipossico con IH (Intermittent Hypoxia) si basa sul principio per cui l'esposizione ad uno stressor lieve ma potenzialmente dannoso (l'ipossia) può aumentare la resilienza delle cellule/tessuti bersaglio (32, 33), stimolandoli alla flessibilità nella risposta adattativa.

Si generano primariamente adattamenti mitocondriali, coordinati dalle varie molecole di HIF, che aumentano l'efficienza del trasporto di elettroni per mantenere costante la produzione di energia sottoforma di ATP.

Inoltre, IH non sembra provocare stress ossidativo dannoso con elevata produzione di ROS, come avviene invece nell'ipossia prolungata. L'Hypoxia conditioning stimola anche la mobilitazione di cellule immunitarie e l'aumento dell'immunità innata, regolando la segnalazione dell'infiammazione promossa da citochine infiammatorie e NF- κ B (34).

Il condizionamento ipossico potrebbe potenzialmente modulare la proliferazione e la durata delle cellule staminali mesenchimali, suggerendo applicazioni di IH per le terapie con cellule staminali (35; 36). Inoltre, è stato dimostrato che possa indurre un rimodellamento osseo adattativo con stimolo alla formazione ossea (37; 38).

Infine, le difese antiossidanti potenziate dal Hypoxia conditioning possono minimizzare la vulnerabilità neuronale ai ROS (39) e migliorare la neurogenesi per adattamenti metabolici (40).

Questi benefici vengono trasposti anche a livello sistemico.

Per quanto riguarda la risposta ventilatoria, l'IH provoca l'aumento progressivo della risposta ventilatoria all'ipossia (HVR) e la facilitazione ventilatoria a lungo termine (vLTF). (41)

Oltre alle risposte ventilatorie, l'attivazione del sistema nervoso simpatico e/o l'inibizione parasimpatica mediano gli adattamenti cardiovascolari acuti all'ipossia, come aumento

della frequenza cardiaca (HR), della gittata cardiaca (CO), della resistenza vascolare periferica (SVR) e della pressione arteriosa sistemica, complessivamente supportando il delivery di ossigeno al cervello e ai tessuti attivi (DO₂). Il condizionamento all'ipossia potrebbe quindi andare a migliorare queste risposte cardiovascolari associate a riduzioni delle frequenze cardiache a riposo e cardioprotezione contro infarti e aritmie (42).

L'esposizione all'ipossia ambientale modifica anche la viscosità del sangue per effetto dell'eritropoiesi e dell'aumento della quota corpuscolata del tessuto ematico (ematocrito) e il comportamento dei globuli rossi (43). La vasocostrizione ipossica nei polmoni, concomitante alla vasodilatazione nella maggior parte degli altri letti vascolari, altera la distribuzione del sangue in tutto il corpo oltre al rapporto ventilo/perfusorio (44). In risposta, il volume plasmatico diminuisce e la massa totale di emoglobina (Hb) aumenta in risposta all'esposizione ipossica (45). La risposta dell'Hb non può però compensare la diminuzione di volume plasmatico; perciò, il volume sanguigno totale diminuisce a sua volta in seguito all'esposizione intermittente all'altitudine (46).

Indipendentemente dalla capacità del sangue di trasportare O₂, gli adattamenti ematologici possono, tuttavia, mediare altri benefici correlati all'IH, ad esempio la tolleranza all'esercizio (47).

Anche a livello metabolico, IH porta a svariati benefici attraverso la regolazione dell'appetito, il metabolismo e la disponibilità e utilizzo di nutrienti, con l'obiettivo di virare a pathways anaerobiche, come la glicolisi anaerobica, per mantenere livelli sufficienti di produzione energetica anche in condizioni di ipossia o di sbilanciamento DO₂/VO₂ come negli sforzi fisici estremi.

Inoltre, IH può portare a benefici in termini di percezione del dolore, in quanto l'ipossia modula la sensazione del dolore, con ruoli centrali di HIF, vie infiammatorie e la loro interazione (48, 49).

Infine, in base alla dose ipossica e alla durata, possono verificarsi effetti benefici o potenzialmente dannosi per le funzioni neurologiche. Uno stato ipossico grave o persistente può causare perdita di coscienza e danni cerebrali permanenti (50); mentre uno stato ipossico "funzionale" promuove adattamenti cerebrali benefici che risultano in un aumento delle capacità cerebrali (51, 52, 53). L'esposizione ad ipossia in contesti di

allenamento può condizionare i soggetti a performare meglio in situazioni operative che prevedano l'esposizione ad ipossia. Questo vale per esempio per piloti, astronauti, alpinisti ed altri.

L'Iperossia

Lo stato di iperossia si verifica in seguito ad un aumento della pressione d'ossigeno (P_{aO_2}) all'interno dell'organismo, data da un aumento della pressione barometrica (pO_2) o della percentuale d'ossigeno nella miscela di gas ispirati (FiO_2). (54)

L'aumento della pressione ambientale avviene in contesti subacquei oppure in medicina iperbarica, anche chiamata "medicina dell'ossigeno", che viene da lungo tempo utilizzata nel campo medico per gli svariati effetti dell'esposizione iperossica sul nostro organismo.

A seconda della pressione parziale di ossigeno nei tessuti, l'effetto terapeutico dell'ossigenazione può variare da una semplice sostituzione di sostanze, quando si utilizza l'iperossia normobarica per ripristinare i livelli di ossigeno nei tessuti a valori normali (da 80-120 mmHg nel sangue arterioso a circa 30-40 mmHg nei tessuti periferici), fino all'ossigenazione iperbarica quando la respirazione di ossigeno iperbarico a 2,5-3,0 ATA porta i tessuti a superare di gran lunga questi valori basali (55).

Nuovi dati mostrano che anche un aumento minimo della pressione parziale dell'ossigeno inneschi efficientemente reazioni cellulari, ma molto dipende dalla durata e dall'intensità dello stimolo iperossico, generando effetti benefici sull'organismo o risposte dannose. (56)

L'iperossia di per sé ha un effetto ossidante nel nostro organismo sbilanciando l'equilibrio Redox verso uno stato ossidativo. La risposta molecolare all'iperossia però, tramite una upregulation della trascrizione dei principali meccanismi antiossidanti, può aumentare l'efficienza del nostro organismo nella risposta antiossidante riducendo l'infiammazione dovuta alla disregolazione di radicali liberi e sopprimendo l'attività di citochine pro-infiammatorie e di fattori di trascrizione come NF-kB. (57)

Può, inoltre, accelerare la guarigione di ferite per aumento della proliferazione cellulare e dell'angiogenesi, stimolando la proliferazione di collagene; oppure determinare effetti

tossici su specifici batteri anaerobici e antimicotici, contrastando infezioni croniche e resistenti ad antibiotici. (58)

Nonostante questi effetti positivi, esistono vari effetti dannosi come: tossicità da ossigeno, stress ossidativo, effetti vascolari e sul sistema immunitario, alterazioni a livello molecolare.

Anche in clinica si tende ad abusare dell'ossigeno incorrendo in numerosi effetti collaterali negativi. (59)

L'esposizione prolungata all'iperossia può, infatti, causare danni al sistema nervoso centrale, denominato *effetto Paul Bert*, e ai polmoni, causando infiammazione e fibrosi (*effetto Lorrain-Smith*). (60). Inoltre, l'elevata pressione di ossigeno nei tessuti può generare un eccesso di radicali liberi, specie reattive dell'ossigeno (ROS), andando a generare danni cellulari ossidativi. (61)

L'iperossia può causare vasocostrizione, riducendo il flusso in alcune aree. Questa condizione è particolarmente pericolosa per pazienti affetti da problematiche cardiovascolari preesistenti. (62)

A lungo termine, l'esposizione a livelli elevati di ossigeno può sopprimere alcune funzioni del sistema immunitario, rendendo l'organismo più vulnerabile a infezioni. (63)

Infine, l'iperossia può attivare segnali cellulari stressanti che coinvolgono fattori di trascrizione, come HIF-1 α , che inducono risposte adattive che comportano danni ossidativi con ripercussioni all'apparato muscolo-scheletrico. (64)

Tutti questi effetti dipendono dalla curva dose-risposta in cui basse dosi di iperossia possono essere percepite come uno stress ipossico, attivando HIF-1 α e meccanismi di risposta adattivi, mentre alte dosi di iperossia portano a stress ossidativo e attivazione di NRF2 e NF- κ B, che inducono una risposta pro-infiammatoria e antiossidante. A seconda del bersaglio terapeutico, quindi, potrebbe essere più desiderabile usare una lieve iperossia (dal 30% al 40-50%), o, d'altra parte, provocare stress ossidativo utilizzando la somministrazione di HH/VHH potrebbe essere considerato un effetto più appropriato e desiderabile. (65)

L'Iperossia intermittente

Questo regime terapeutico si riferisce all'esposizione a elevate concentrazione di ossigeno per limitati periodi di tempo, seguiti da intervalli di ritorno a stati normossici. È una metodica ampiamente utilizzata nella terapia iperbarica in quanto a dimostrato svariati benefici e minori rischi rispetto all'esposizione prolungata all'iperossia.

L'iperossia è in grado di attivare diverse risposte cellulari come HIF-1 α , che viene attivato dal ritorno allo stato normossico (come avviene per l'esposizione allo stato ipossico). Questo fenomeno è noto con il nome di "paradosso dell'ossigeno normobarico" (NOP), cioè che cambiamenti relativi della disponibilità di ossigeno, piuttosto che condizioni ipossiche (o iperossiche) stabili, coordinano gli effetti trascrizionali di HIF-1 α . Questo fenomeno ha diversi nomi, come il "Paradosso Iperossico-Ipossico" o il "Paradosso dell'Ossigeno Normobarico", a seconda dell'intervallo di variazione della PO₂ imposta. (66)

Viene attivato inoltre il fattore NRF2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2), che induce l'espressione di geni che codificano enzimi antiossidanti, migliorando la capacità cellulare di contrastare lo stress ossidativo. (67)

L'esposizione ad una terapia iperbarica intermittente consente di diminuire il rischio di tossicità da ossigeno rispetto all'esposizione continua ad elevati livelli d'ossigeno, prevenendo i potenziali danni ai tessuti polmonari e al sistema nervoso centrale (68). Inoltre, promuove effetti ormetici andando a generare una risposta adattativa che può aumentare la resistenza delle cellule allo stress ossidativo e migliorare le difese antiossidanti. (69)

L'iperossia intermittente rappresenta, quindi, una strategia promettente in diversi ambiti clinici, grazie alla sua capacità di attivare risposte cellulari benefiche e minimizzare i rischi associati alla tossicità da ossigeno.

L'esposizione ipossica/iperossica in soggetti sportivi

Negli ultimi anni, sta guadagnando sempre più popolarità l'approccio "live low-train high" come strategia di miglioramento della performance negli atleti d'élite, nonché come

strumento di trattamento non farmacologico per pazienti affetti da svariate patologie o in un'ottica preventiva per soggetti sani.

Ad oggi, esistono diverse metodiche di allenamento che sfruttano l'esposizione a stati di ipossia/iperossia, come ad esempio "Interval Hypoxic training" (IHT), "Sprint Interval Training in Hypoxia" (SIH), o ancora "Resistance Training in Hypoxia" (RHT); ma anche allenamenti che alternano fasi in ipossia seguite da fasi in iperossia. (70)

Dall'altro lato, per evitare una diminuzione dell'intensità dell'allenamento dovuta al ridotto assorbimento di ossigeno in ipossia, è stato sviluppato anche il modello "live high-train low" (LHTL): gli atleti vivono in ambienti ipossici mentre l'allenamento si svolge in condizioni normossiche. L'efficacia degli stimoli di allenamento con periodi di ipossia più lunghi (>12 ore al giorno, per più settimane) è stata confermata da diversi studi, ma c'è ancora disaccordo all'interno della letteratura per quanto riguarda il miglioramento delle prestazioni sportive, soprattutto per durate di esposizione più brevi. (71)

È stato infatti dimostrato da numerosi studi, come l'allenamento ad alta intensità in condizioni ipossiche o una combinazione di metodi ipossici, sembrano essere un approccio promettente per il miglioramento delle prestazioni in popolazioni moderatamente o ben allenate e atleti d'élite. (72)

Questo perché, come visto in precedenza, l'esposizione a stati ipossici/iperossici comporta svariati benefici fisiologici che possono aumentare le prestazioni dell'individuo, sempre che queste metodiche rispettino la "dose ipossica" adeguata.

Nonostante le sempre più numerose evidenze sull'efficacia e l'efficienza del metodo "live low-train high" (LLTH), permangono svariati dubbi e la necessità di fare chiarezza sull'argomento. Ad oggi, infatti, non esiste una forma di LLTH che migliori più efficacemente le prestazioni fisiche (73), anche a causa della necessità di svolgere studi più controllati e meccanicistici che prevedano un campione di popolazione più ampio. La "dose ipossica" appropriata, inoltre, non è stata ancora del tutto individuata, portando conseguentemente a riscontrare casi di sovrallenamento o sovraffaticamento in atleti sottoposti ad allenamenti LLTH.

Rimane inoltre da determinare se ogni metodo LLTH sia meglio utilizzato come strategia di pre-acclimatamento, miglioramento della risposta all'allenamento dopo un campo di

allenamento in altitudine, accelerazione della riabilitazione muscoloscheletrica e/o prevenzione del de-training durante l'immobilizzazione negli atleti infortunati. Il valore del LLTH come strategia di "recupero delle prestazioni", ad esempio per limitare l'entità del danno muscolare (74), è promettente (75), ma andrebbe approfondita.

Training ipossico/iperossico

Questa metodica di allenamento, che prevede periodi di esposizione ipossica-iperossica intermittenti (IHHE), sembra potenzialmente benefica per lo sportivo. Si ipotizza, infatti, che sostituire la normossia con l'iperossia moderata possa aumentare la risposta adattativa allo stimolo ipossico intermittente mediante la regolazione positiva delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dei geni inducibili dall'ipossia (76). La formazione moderata di radicali superossido può infatti promuovere benefici come l'ossidazione di molecole danneggiate, la sintesi di molecole messaggere e la segnalazione extra- e intracellulare (77), conducendo infine alla promozione di geni antiossidanti e antinfiammatori.

La maggioranza degli studi in letteratura analizzano protocolli di esercizio in cui ai soggetti viene somministrata la miscela di gas tramite maschere facciali collegate a generatori di ipossia. L'intensità dell'ipossia e dell'iperossia varia da $FiO_2=0.10-0.12$ e $FiO_2=0.30-0.40$, rispettivamente. Il numero di cicli ipossici-iperossici varia da 4 a 8 per sessione e la durata del ciclo per i periodi di ipossia e iperossia varia da 2 a 7 minuti e da 1 a 6 minuti, rispettivamente, per un tempo totale impiegato per singola procedura IHHE da un minimo di 35 ad un massimo di 50 minuti. L'IHHE è stata eseguita con una frequenza di 2-5 sessioni a settimana, per un periodo di intervento di 3-6 settimane. In alcuni studi, inoltre, la reazione individuale dei pazienti a uno stimolo ipossico è stata determinata con un test di ipossia condotto prima dell'intervento IHHE. Il test di ipossia consisteva nel respirare una miscela di gas ipossico ($FiO_2=0.10-0.12$) per 10-20 minuti sotto monitoraggio costante della frequenza cardiaca o SpO_2 o entrambi. (78)

Potenziati campi di utilizzo futuri e applicazioni nella performance

Le costanti ricerche cliniche e lo sviluppo di nuove tecnologie apre la strada a innovazioni anche nel campo delle metodiche LLTH, predisponendo macchinari sempre più avanzati ed efficienti che possano andare a modulare la curva dose-risposta dell'esposizione all'ipossia o all'iperossia per ottenere risultati ottimali, risolvendo quelle che purtroppo sono le limitazioni tuttora presenti. Un esempio diretto nel contesto sportivo è l'attrezzatura gonfiabile ipossica simulata mobile che consente a nuotatori o giocatori di sport di squadra di allenarsi in ipossia, eseguendo intervalli di nuoto, sprint ripetuti di corsa o giochi su piccoli campi direttamente nei loro ambienti naturali (79), questo perché l'esposizione ipossica/iperossica migliora le prestazioni di fitness cardiorespiratoria, migliora il recupero post-allenamento e può essere un buon mezzo di prevenzione e contrasto della sindrome da sovrallenamento.

Nell'ambito medico, invece, l'utilizzo di camere iperbariche e strumentazione che simuli lo stato ipossico/iperossico sta assumendo sempre più popolarità, venendo impiegata in ottica riabilitativa, come nel caso di patologie cardiache e per il recupero di lesioni muscolo-scheletriche; oppure nel campo della medicina clinica e neurologia, per il trattamento di ferite e infezioni gravi o per il recupero post-ictus e traumi cranici; o addirittura utilizzata come terapia aggiuntiva per aumentare l'efficacia di trattamenti antitumorali come la radio/chemioterapia. (80)

Contesti specifici: subacquei, alpinisti, piloti, sottomarini, astronauti

Le camere iperbariche e l'allenamento ipossico/iperossico vengono molto spesso utilizzati per migliorare le prestazioni e adattare i soggetti alle condizioni sfidanti che caratterizzano ambienti estremi e sport, come l'alpinismo, sport di immersione, ma anche professionisti come piloti, sottomarini e astronauti.

In chi pratica sport d'immersione, in particolare l'apnea, anche conosciuto come "breath hold diving", sviluppare una buona tolleranza all'ipossia è fondamentale. L'allenamento ipossico è essenziale per preparare i soggetti alle lunghe e tendenzialmente ripetute immersioni in cui la disponibilità di ossigeno è limitata. L'esposizione iperossica invece

è propria dei subacquei con bombole (SCUBA) dove l'aumento della pressione ambientale induce un aumento della PaO₂. Inoltre, le camere iperbariche, vengono utilizzate per trattare la malattia da decompressione (MDD), patologia in cui si formano delle bolle d'aria in situ nei tessuti, che causano la rottura meccanica di quest'ultimi, l'occlusione del flusso sanguigno, l'attivazione piastrinica, la disfunzione endoteliale e la perdita capillare (81). Chi pratica diving è esposto al rischio di sviluppo di tale patologia per un'inadeguata risalita in superficie dopo l'immersione.

Anche nel caso di sottomarini, esposti a condizioni in cui l'ossigeno è carente, come nel caso di sportivi d'immersione, l'allenamento ipossico può essere d'aiuto per la preparazione. Le camere iperbariche vengono, anche qui, utilizzate per trattare danni provocati da decompressione e ipossia eccessiva, che possono verificarsi durante le immersioni in sottomarini. (82)

L'allenamento LLTH può essere sicuramente benefico per l'alpinismo, in modo che il soggetto sia preparato per l'ascesa in quota, migliorando la sua capacità di acclimatamento e riducendo il rischio di sviluppo di mal di montagna. Questa condizione patologica è data da una salita in quota troppo repentina, senza precedente acclimatamento. Inizialmente, tra gli altri sintomi, il soggetto percepisce cefalea, difficoltà respiratorie e alterazioni del sonno, fino ad arrivare allo sviluppo di gravi complicanze, come edema polmonare e cerebrale.

Le camere iperbariche sono utilizzate, anche in questo caso, come primo mezzo di soccorso per il trattamento dell'edema polmonare e cerebrale (HAPE e HACE) conseguente al mal d'altitudine. A oggi vengono utilizzati anche presidi "da campo" come sacche iperbariche, per un trattamento immediato in quota. (83)

Nel caso di piloti, l'allenamento ipossico può aiutare a migliorare le prestazioni fisiche per affrontare l'alta quota. Le camere ipossiche possono infatti aiutare i soggetti a riconoscere e gestire l'ipossia d'alta quota, andando a simulare le condizioni barometriche a cui sono esposti quotidianamente durante il volo. (84)

Infine, anche per un'astronauta l'allenamento ipossico/iperossico può essere benefico, in quanto prepara questi professionisti ad operare in ambienti con basso ossigeno e a gestire le emergenze date da eventuali perdite di pressione in cabina. Le tecnologie iperbariche

possono essere utilizzate anche in questo caso per trattamenti di emergenza, ma anche per simulare le condizioni di decompressione che si verifica in attività extraveicolari (EVA), ovvero tutte quelle attività svolte dagli astronauti nello spazio aperto all'esterno del proprio veicolo o stazione, anche chiamate "passeggiate nello spazio". (85)

Precedenti esperienze

Nella letteratura scientifica è ampiamente descritto e riconosciuto il potenziale dello stimolo ipossico nel contesto clinico e sportivo, grazie alla sua capacità di agire sul metabolismo umano, promuovendo la neovascolarizzazione e la proliferazione di fattori di crescita. Protocolli di allenamento ipossici sono ampiamente utilizzati nel training di sportivi professionisti, agonisti e amatoriali. Lo stimolo iperossico, invece, è stato sempre utilizzato come presidio per agevolare processi metabolici e respiratori in genere. Tuttavia, da qualche anno, viene talvolta utilizzato per migliorare le prestazioni sportive favorendone i tempi di recupero.

Alla luce dei risultati di protocolli respiratori ipossici e iperossici, è stata precedentemente testata su volontari sani una respirazione a riposo al 15%, 30% e 50% di ossigeno; 100% di ossigeno a 1.5 ATA e 2.5 ATA.

Lo studio Bosco et al, 2021, aveva evidenziato un effetto benefico della risposta ossidativa e infiammatoria indotte da respirazioni iperossigenate con e senza esercizio fisico. In alcuni casi il beneficio risulta proporzionale all'incremento delle diverse pressioni parziali di ossigeno inalate durante un protocollo per 4 settimane.

I protocolli prevedevano una respirazione continua a riposo al 30% e 50% di ossigeno; 100% di ossigeno a 1.5 ATA e 2.5 ATA e/o con esercizio fisico. I risultati confermavano gli effetti allenanti dell'ipossia al 15% e i benefici dei protocolli di recupero respirando

miscela iperossigenata al 30 e 50% con o senza esercizio.

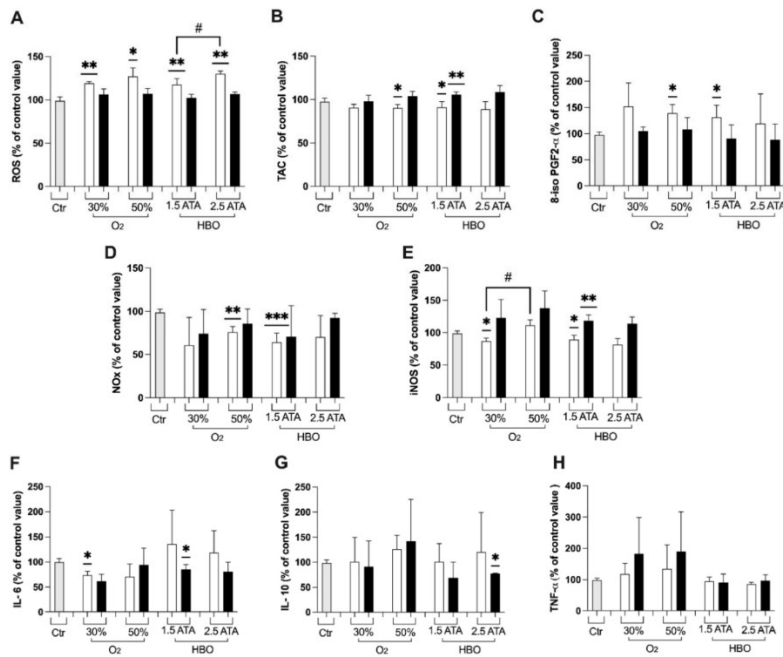


Figura 3. Tratto da: (Bosco et al 2021)(86) Grafico a istogramma (% ± SD) di (A) Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), (B) Capacità Antiossidante Totale (TAC), (C) 8-isoprostano (8-iso PGF-2α), (D) Metaboliti del NO (NOx), (E) iNOS, (F) IL-6, (G) IL-10 e (H) TNF-α, ottenuti da campioni di plasma raccolti. Il gruppo di controllo (Ctr) è riportato in grigio; le barre bianche e nere identificano T1 e T2, rispettivamente. Differenze significative intra-gruppo: * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001. Differenza significativa tra gruppi: # p < 0.05.

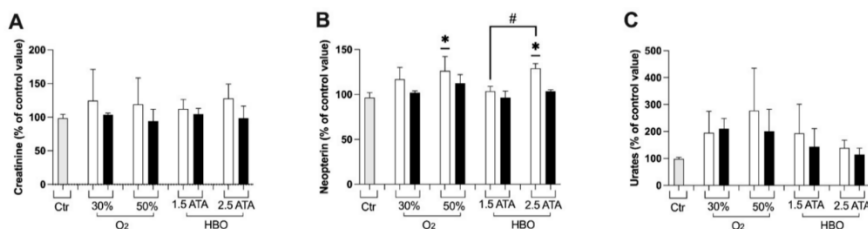


Figura 4. Tratto da: (Bosco et al 2021)(86) Grafico a istogramma (% ± SD) dei biomarcatori della funzione renale: (A) Creatinina, (B) Neopterin e (C) Urati. Il gruppo di controllo (Ctr) è riportato in grigio; le barre bianche e nere identificano T1 e T2,

*rispettivamente. Differenza significativa intra-gruppo: * $p < 0.05$. Differenza significativa tra gruppi: # $p < 0.05$.*

Confermati i protocolli ipossici per il miglioramento della prestazione in atleti, così come la somministrazione di miscele iperossiche nel periodo di recupero, nel seguente studio si indaga il ruolo delle miscele ipo/iperossiche intermittenti associate ad esercizio fisico.

La terapia ipossico-iperossico intermittente (IHHT) è una procedura non invasiva e sicura che prevede la respirazione di aria ipossica (bassa quantità di ossigeno) e iperossica (alto contenuto di ossigeno) a intervalli variabili attraverso una maschera; può essere associata a esercizio fisico, in questo modo la IHHT pone una leggera quantità di stress sul sistema respiratorio e in risposta il nostro corpo attiva un processo rigenerante.

Di conseguenza, l'IHHT può agire:

- modulando la nostra risposta allo stress ossidativo e all'infiammazione;
- producendo un effetto protettivo a livello vascolare e muscolare;
- dando benefici a livello ematico dei parametri metabolici;
- migliorando il pattern neurocognitivo.

Materiali e metodi

Disegno sperimentale

Questo studio interventistico longitudinale non randomizzato indaga gli effetti di due protocolli IHHT su volontari sani.

I dodici soggetti sono stati reclutati al fine di eseguire un allenamento di alternanza ipossia – iperossia (IHHT) durante blando sforzo fisico standardizzato. Il protocollo prevedeva una camminata su treadmill a 3,5/4,5 km/h, 60 – 70 steps/min. Per quattro settimane consecutive i soggetti hanno eseguito questi allenamenti due volte a settimana per un totale di otto allenamenti. Durante l'allenamento un medico era sempre presente in loco e i soggetti erano stati istruiti ad interrompere il protocollo al sopraggiungere di sintomi intollerabili, in particolare durante il periodo di ipossia.

Sono stati monitorati frequenza cardiaca e saturazione parziale di ossigeno periferica (SpO₂) con un pulsossimetro (GIMA Oxy 50, GIMA spa, Milano, Italia).

All'inizio dell'esperimento, prima del primo allenamento, sono stati raccolti campioni di saliva, urina e sangue come basale. Successivamente ogni due allenamenti sono stati raccolti campioni di saliva e urine. Al termine dell'ottavo allenamento sono stati raccolti saliva, urine e sangue.

I soggetti venivano assegnati a due gruppi non randomizzati che differivano uno dall'altro per il protocollo di esercizio scelto. Il primo gruppo è stato chiamato a svolgere il protocollo "Training", che prevede un totale di 45 minuti di allenamento complessivo, nel quale i soggetti sono sottoposti a tre mini-sessioni composte da: 5' al 14% FiO₂ (frazione inspirata di O₂), seguiti da 2,5' al 21% FiO₂, 5' al 14% FiO₂, per terminare con 2,5' al 30% FiO₂.

Il secondo gruppo, invece, ha svolto il protocollo "Conditioning", in cui i soggetti sono stati sottoposti a 3 mini-sessioni da 15 minuti, per un totale complessivo di 45 minuti, ripartiti in modo differente dal gruppo "Training" per quanto riguarda la dose di frazione inspirata di ossigeno (FiO₂). Il gruppo "Conditioning", infatti, ha svolto intervalli da 2,5' con alternanza di dosi ipossiche e normossiche (14% FiO₂ – 21% FiO₂), inframmezzato da un solo intervallo di 2,5' al 30% FiO₂.

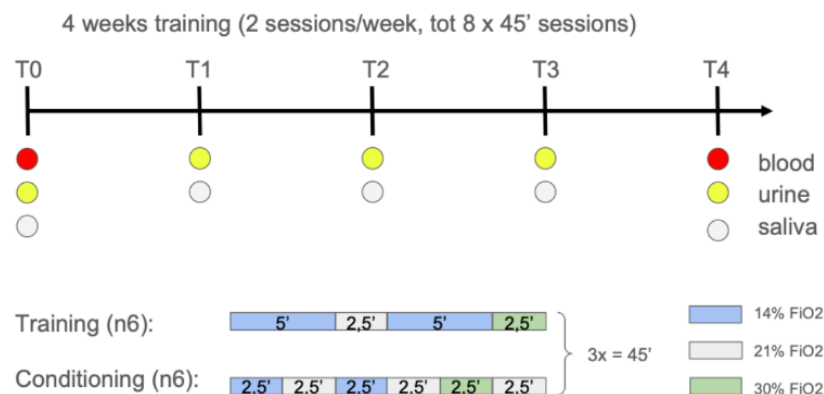


Figura 5. Rappresentazione schematica del protocollo di studio della durata di 4 settimane per un totale di otto sessioni di allenamento. Timeline della raccolta campioni: T0, baseline; T1, dopo due allenamenti; T2, dopo quattro allenamenti; T3, dopo sei

allenamenti; T4, finale, dopo otto allenamenti. I due protocolli training e conditioning differiscono per la durata del periodo di ipossia, che nel protocollo training arriva a 30' complessivi mentre nel protocollo conditioning è dimezzata.

L'impegno richiesto ai volontari durante l'esercizio fisico è stato quantificato attraverso una scala di Borg e il monitoraggio garantito da un saturimetro utilizzato durante tutta la prova, come riportato in tab 1.

Un gruppo di collaboratori ha supervisionato i partecipanti durante l'esecuzione del protocollo, garantendo che la raccolta dei campioni e l'esecuzione degli esercizi fossero conformi alle procedure necessarie per la standardizzazione. Ai partecipanti veniva richiesto di indossare una maschera naso-bocca collegata a un dispositivo che forniva le miscele gassose predefinite, permettendo loro di alternare la respirazione tra aria a basso contenuto di ossigeno (simulando condizioni di alta quota), aria normobarica e aria con concentrazioni di ossigeno superiori alla norma, in sessioni ripetute secondo il protocollo specifico.

La macchina OX2 Master® (ZetaPlus Health, Vicenza, Italy) consisteva in un concentratore di ossigeno a membrana che poteva essere settata a varie FiO₂ secondo il software. Due sensori nell'uscita respiratoria garantivano l'esattezza della FiO₂ impostata con margine di errore dell'1%. L'aria veniva inoltre depurata da inquinanti e polveri sottili all'ingresso della macchina tramite appositi filtri. Il volume respiratorio veniva garantito tramite un pallone da 3l che fungeva da reservoir. Due valvole unidirezionali nella maschera stessa garantivano che non ci fosse ricircolo di CO₂.

Durante ogni sessione di allenamento IHHT, i partecipanti sono stati monitorati in tempo reale tramite un saturimetro, consentendo la misurazione continua e non invasiva della SpO₂ e della frequenza cardiaca. Nel nostro protocollo, durante il periodo di ipossia con una FiO₂ del 14%, la saturazione dell'ossigeno registrata è scesa fino al 78%. Per garantire la sicurezza, durante l'esecuzione del protocollo è stato sempre richiesto di prestare particolare attenzione a eventuali sintomi di ipossia, quali affaticamento, nausea e vertigini. Inoltre, il carico di lavoro fisico durante l'allenamento è stato valutato al termine di ogni sessione IHHT utilizzando la scala di Borg CR10.

A seguito di ogni allenamento, inoltre, ad ogni soggetto è stato chiesto di valutare lo sforzo e i sintomi percepiti attraverso la scala di Borg e The Lake Louise Acute Mountain

Sickness Score. Quest'ultima scala è impiegata nella valutazione dell'esposizione all'ipossia, in quanto stima la comparsa di mal di montagna acuto (AMS) attraverso la valutazione di quattro sintomi specifici: mal di testa, sintomi gastrointestinali, fatigue e/o debolezza, vertigini/sensazione di testa leggera. (87)

Soggetti

Un gruppo di 12 volontari sani, 6 maschi e 6 femmine, le cui caratteristiche sono riportate nella tabella 2 sono stati reclutati previo consenso informato ed assegnati casualmente ai due gruppi di studio in maniera bilanciata. I soggetti non presentavano patologie croniche di rilievo, non assumevano farmaci su base cronica e tutti tranne due eseguivano più di tre allenamenti settimanali di attività prevalentemente aerobica.

Variabile	Media	Min - Max	N° soggetti
Femmine			6 / 12
Età	29,83	24 -35	
Peso	68,5	53 -82	
BMI	22,44	19 - 25,25	
> 3 allenamenti settimana			10 / 12
Fumatori			2 / 12
Assunzione regolare di alcolici (max 3 dosi a settimana)			11 / 12

Tab 2. *Descrizione campione sperimentale*

Biomarkers

Per quanto riguarda il grado di infiammazione, sono stati presi in considerazione i seguenti biomarcatori: grado di produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno, se il grado di produzione supera i range di normalità, diventa un indicatore importante dello stress ossidativo), TAC (Capacità Antiossidante Totale, indica l'efficienza delle difese

antiossidanti nel neutralizzare specie reattive dell'ossigeno (ROS) e altre molecole dannose prodotte durante lo stato di stress ossidativo), 8-iso PGF2 α (8-isoprostaglandina F2-alfa, è un biomarcatore di stress ossidativo, prodotta dalla perossidazione non enzimatica degli acidi grassi polinsaturi (soprattutto l'acido arachidonico) a seguito dell'azione dei radicali liberi), IL-6 (Interleuchina-6, citochina multifunzionale coinvolta nella regolazione delle risposte immunitarie, infiammatorie ed ematopoietiche. Svolge un ruolo fondamentale sia nella difesa contro le infezioni sia nella regolazione dell'infiammazione).

Questi biomarker sono stati scelti appositamente come parametri di valutazione dello stress ossidativo prodotto durante IHHT per valutare:

- L'effetto dell'allenamento ipossico/iperossico sulla capacità antiossidante del corpo;
- Come varia la capacità antiossidante durante il periodo di allenamento rispetto al condizionamento o ad altre condizioni di controllo;
- L'adattamento del sistema antiossidante in risposta all'aumento di radicali liberi indotto dall'ipossia intermittente.

(88, 89, 90, 91)

Altri parametri analizzati sono stati NO_x (gruppo di composti formati dall'ossido nitrico (NO) e dal diossido di azoto (NO₂)), NO₂ (forma ossidata dell'ossido nitrico e parte del gruppo dei NO_x, prodotto della reazione tra l'ossigeno e l'ossido nitrico), 3-NT (3-Nitrotirosina, marcatore del danno ossidativo alle proteine). NO_x e NO₂ sono utili per valutare la produzione e il metabolismo dell'ossido nitrico, e quindi possono fornire informazioni sullo stato della funzione endoteliale e della vasodilatazione.

3-NT è invece un marcatore di danno ossidativo più specifico, indicativo di stress ossidativo e infiammazione, che può compromettere la funzionalità delle proteine.

Questi parametri sono spesso monitorati insieme per valutare il bilancio redox (ossidazione-riduzione) nel corpo e per identificare condizioni patologiche che coinvolgono stress ossidativo, infiammazione e disfunzione endoteliale.

(92, 93)

Per valutare la funzione renale e la risposta immunitaria conseguente all'esposizione di IHHT sono stati utilizzati i seguenti parametri: Creatinina (i livelli di creatinina nel sangue sono utilizzati come indicatore della funzionalità renale), Neopterina (prodotta in risposta all'attivazione del sistema immunitario, i suoi livelli possono aumentare durante le infezioni o le infiammazioni), Acido urico (coinvolto nella protezione contro lo stress ossidativo).

Analisi dei campioni

Circa 9 ml di sangue venoso sono stati prelevati da una vena antecubitale, con i soggetti seduti o sdraiati su un letto. Ogni volta, i campioni per valutare lo stress ossidativo sono stati raccolti in provette con litio eparinizzato e EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson, USA). Il plasma è stato separato per centrifuga (5702R, Eppendorf, Germania) a $3500 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. I campioni di plasma ed eritrociti sono stati quindi conservati in più aliquote a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ fino al momento del dosaggio. I campioni sono stati scongelati solo una volta prima dell'analisi, eseguita entro 1 mese dalla raccolta. L'urina è stata raccolta tramite minzione volontaria in un contenitore sterile e conservata in più aliquote a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ fino al momento del dosaggio e scongelata solo prima dell'analisi. I campioni di sangue e urina sono stati raccolti in camere pre- e post-iperbariche. Circa 1 mL di saliva è stato ottenuto dai dispositivi Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Germania). I soggetti sono stati istruiti sull'uso corretto (ad esempio, non mangiare, bere o assumere farmaci per via orale 1 ora prima della raccolta del campione) (Mrakic-Sposta et al. 2020). I campioni di saliva sono stati raccolti prima di iniziare il protocollo (T0) prima del terzo allenamento (T1), 48 msw (profondità, T2) e 25 msw (ascendente, T3) e 10 minuti dopo la decompressione (T4). Le Salivette sono state centrifugate a $1500 \text{ g} \times 20 \text{ minuti}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e la saliva recuperata è stata trasferita e suddivisa in aliquote, quindi conservata a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ fino al momento dell'analisi e scongelata solo una volta prima dell'analisi. Approssimativamente 1 mL di saliva è stato ottenuto dai dispositivi Salivette (Sarstedt, Nümbrecht, Germania). Le urine sono state raccolte in un contenitore sterile (20 mL) e conservato a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Uno strumento di risonanza paramagnetica elettronica in banda X (E-Scan-Bruker BioSpin, GmbH, Billerica, MA USA) è stato utilizzato per la misurazione dei ROS nella saliva. La perossidazione lipidica (8-iso-PGF2 α), i livelli di nitriti e nitrati (NOx; NO₂), la

nitrotirosina (3NT), lo stato di infiammazione (IL-6) e la capacità antiossidante totale (TAC) sono stati misurati attraverso la tecnologia di analisi immunoassorbente legata a enzimi sandwich. Le concentrazioni di creatinina, neopterina e acido urico urinarie sono state misurate con un metodo di cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

Risultati

Statistiche

È stata utilizzata una piccola dimensione del campione, il dCohen con un intervallo di confidenza del 95%, per calcolare la dimensione dell'effetto e il valore corrispondente per ciascun parametro è stato incluso. I cambiamenti percentuali, definiti come $((\text{post-pre volo suborbitale})/\text{pre volo suborbitale}) * 100$), sono stati utilizzati per l'analisi al fine di valutare gli effetti del volo suborbitale sui biomarcatori valutati. I dati sono riportati come (media \pm DS). Tutte le misurazioni sono state eseguite in duplicato e il coefficiente di variazione inter-assay era nel range indicato dal produttore. Le figure sono state create con: GraphPad Prism, GraphPad Software Inc., California, USA, versione 10.3.0, <https://www.graphpad.com/>.

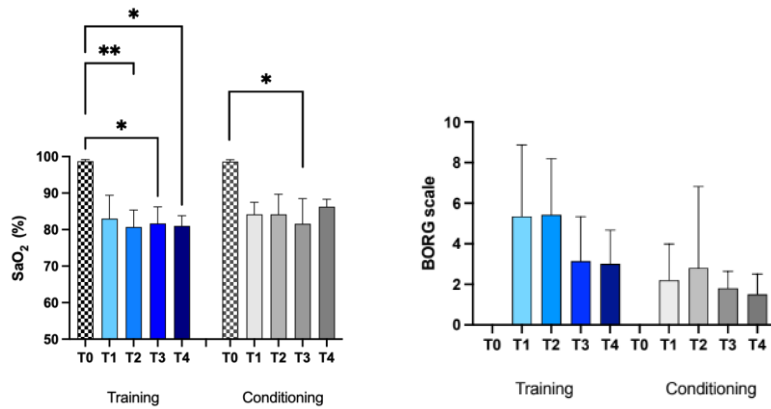
Sicurezza

Al termine delle 4 settimane di allenamento, nessun partecipante ha manifestato grave o preoccupante sintomatologia.

Carico di lavoro

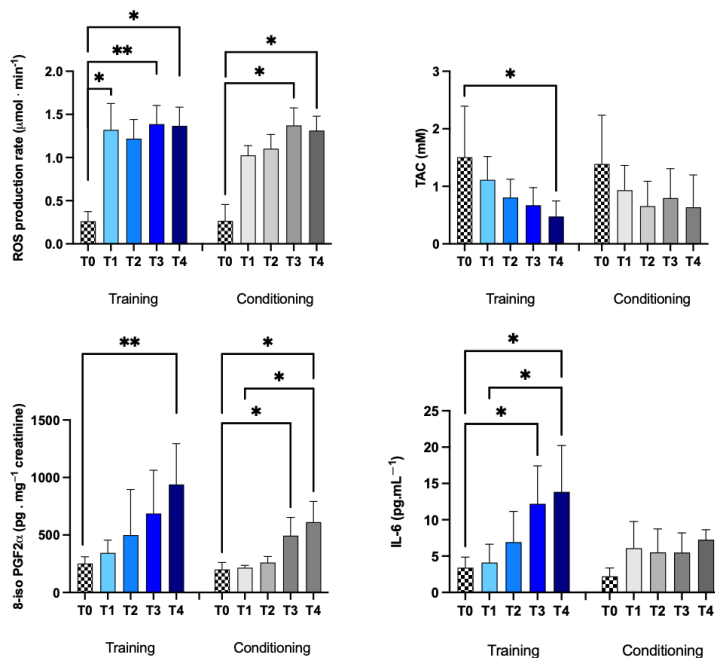
A parità di carico di lavoro si registrano livelli minimi di SpO2 sovrapponibili tra i due gruppi, nonostante le differenze nella durata dei periodi ipossici. Si possono notare delle variazioni statisticamente significative soprattutto per il gruppo training, con diminuzione rispettivamente del 16% a T1, 18% a T2, 17% a T3 e 18% a T4. Per il gruppo conditioning risultata statisticamente significativo la diminuzione del 17% a T3 (-15% T1, -15% T2, -13% T4).

Per quanto riguarda l'aumento della performance fisica e l'adattamento all'ipossia notiamo una riduzione della scala di BORG a partire dalla terza settimana di allenamento per il protocollo training, mentre il carico rimane pressappoco costante ed inferiore per il protocollo conditioning.



Tab 1. Saturazione di ossigeno e scala di valutazione dell'esercizio fisico.

Stress ossidativo e infiammazione



Tab 3. Stress ossidativo e infiammazione

Come si può valutare dai grafici in tab. 3, il protocollo IHHT ha generato nell'organismo dei soggetti una condizione di stress ossidativo crescente nel corso delle 4 settimane di intervento sia nel gruppo training che nel gruppo conditioning. I livelli massimi raggiungono circa il 400% del basale per entrambi i protocolli e si mantengono elevati anche nelle settimane seguenti.

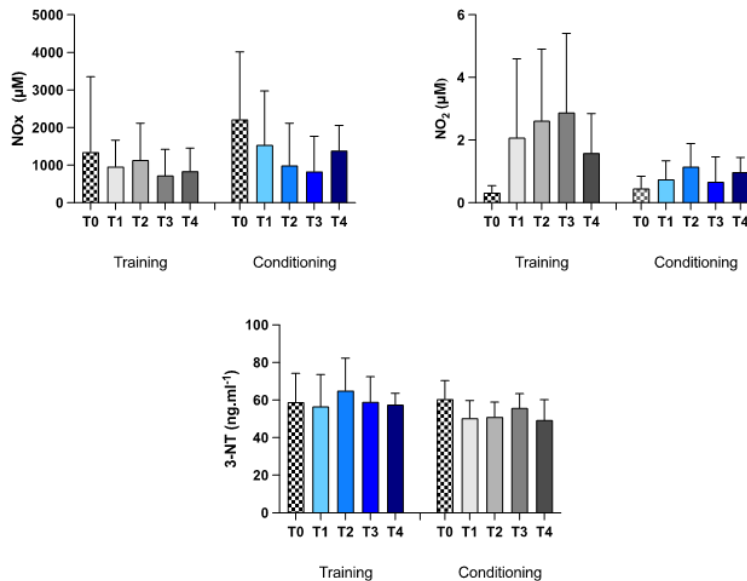
Nel protocollo training, vediamo un aumento di ROS statisticamente significativo in tutte le 4 settimane, rispettivamente del 403% a T1, 364% a T2, 428% a T3, 420% a T4. Nel protocollo conditioning la rilevanza statistica è stata raggiunta solo alla terza e alla quarta settimana di intervento (T1 vs T0 +287%; T2 vs T0 +315%; **T3 vs T0 +417%**; **T4 vs T0 +394%**).

I livelli 8-iso PGF2 α , specchio di perossidazione lipidica di membrana, subiscono un aumento crescente nel corso delle settimane, più marcato nel gruppo training, raggiungendo la rilevanza statistica a T4 con un incremento del 273% rispetto al basale. Per il gruppo conditioning rispettivamente: T1 vs T0 +7%; T2 vs T0 +30%; T3 vs T0 +146%; T4 vs T0 +205%

I livelli di infiammazioni misurati tramite IL-6 mostrano un livello stabile e basso nel protocollo conditioning (T1 vs T0 +174%; T2 vs T0 +148%; T3 vs T0 +147%; T4 vs T0 +227%), mentre nel protocollo training si mostra una cinetica in costante aumento nel corso dei giorni, con aumenti statisticamente significativi in tutte le settimane: T1 vs T0 +21%; T2 vs T0 +103%; T3 vs T0 +258%; T4 vs T0 +306%

La TAC (Capacità Antiossidante Totale) mostra delle discrepanze tra i due protocolli d'intervento: mentre per il gruppo training vediamo un decremento regolare di questo parametro, evidenziando una capacità antiossidante diminuita perché lo stress ossidativo che l'organismo deve contrastare supera la capacità antiossidante dei sistemi tampone (T1 vs T0 -26%; T2 vs T0 -47%; T3 vs T0 -55%; **T4 vs T0 -68%**); nel caso del protocollo conditioning questa diminuzione è meno marcata, con un accenno alla stabilizzazione verso la quarta settimana (T1 vs T0 -33%; T2 vs T0 -53%; T3 vs T0 -43%; T4 vs T0 -54%).

Pathway NO



Tab 4. *Pathway NO*

Come valutabile dai grafici riportati in tab.4, si è verificata una diminuzione di NOx (sia per il gruppo training che per quello conditioning), che può essere interpretato come un miglioramento della capacità antiossidante dell'organismo, rappresentando un miglioramento nell'equilibrio redox, in cui i sistemi antiossidanti sono in grado di contrastare più efficacemente lo stress ossidativo.

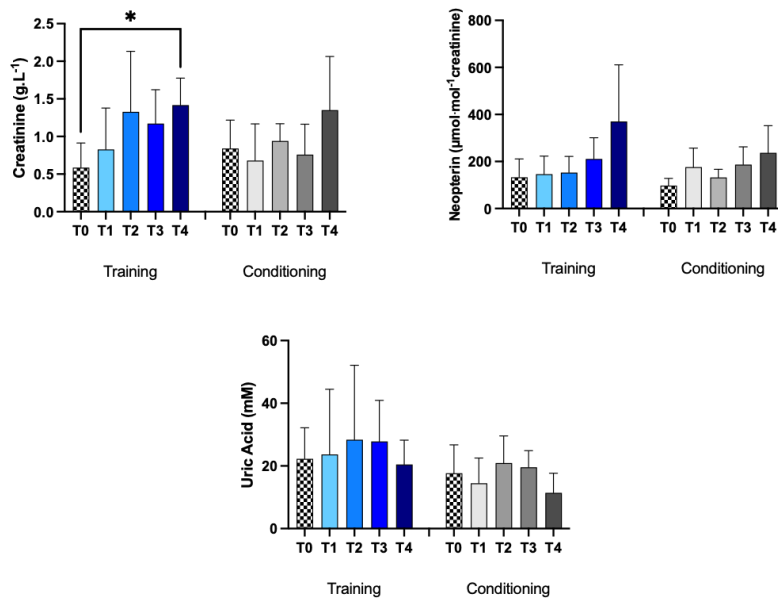
Per il gruppo training abbiamo una diminuzione del 29% T1, 16% T2, 46% T3, 38% T4, mentre per il gruppo conditioning -31% T1, -55% T2, -62% T3, -37% T4, non dimostrando nessun decremento statisticamente significativo.

Inoltre, se la diminuzione dei NOx è accompagnata da una riduzione dei marcatori di danno ossidativo (come il 3-NT), come verificabile dal grafico specifico, in modo rilevante per il gruppo conditioning (T1 vs T0 -17%; T2 vs T0 -16%; T3 vs T0 -8%; T4 vs T0 -19%),(training: T1 vs T0 -4%; T2 vs T0 +10%; T3 vs T0 0%; T4 vs T0 -2%), potrebbe suggerire che il trattamento sta riducendo lo stress ossidativo nell'organismo.

L'andamento incostante di NO₂, sommariamente di aumento, può riflettere la situazione di stress ossidativo a cui i soggetti sono stati esposti. Nonostante l'aumento, va evidenziata la diminuzione di questo parametro al T4, rappresentando un'ulteriore

riconferma dell'adattamento che i soggetti hanno percepito all'ultima settimana di protocollo IHHT.

Funzione renale e risposta immunitaria



Tab 5. *Renal function and immune response*

Come si può vedere dal grafico specifico presente in tab. 5, i livelli di creatinina sono aumentati per entrambi i gruppi indicando una riduzione della funzione renale.

Rispettivamente, per il gruppo training abbiamo un incremento statisticamente rilevante all'ultima settimana di intervento (T1 vs T0 +41%; T2 vs T0 +127%; T3 vs T0 +100%; **T4 vs T0 +142%**); mentre per il gruppo conditioning si riscontrano i seguenti risultati: T1 vs T0 -19%; T2 vs T0 +13%; T3 vs T0 -9%; T4 vs T0 +60%.

Anche il parametro di Neopterina aumenta per entrambi i protocolli, in particolare per il gruppo training al T4 (T1 vs T0 +10%; T2 vs T0 +15%; T3 vs T0 +59%; T4 vs T0 +179%), per un aumento della risposta immunitaria indotto dallo stress ossidativo e metabolico, e per i processi infiammatori stessi in quanto la neopterina è coinvolta nella risposta alla produzione di NO (ossido nitrico) e alla produzione di ROS (Specie Reattive all'Ossigeno). (94)

Per il gruppo conditioning: T1 vs T0 +80%; T2 vs T0 +36%; T3 vs T0 +91%; T4 vs T0 +142%.

I livelli di Acido urico, invece, aumentano nel corso di T1, T2, T3, mentre subiscono una diminuzione a T4 per entrambi i gruppi, rispettivamente per il gruppo training (T1 vs T0 +6%; T2 vs T0 +27%; T3 vs T0 +25%; T4 vs T0 -8%) e per il gruppo conditioning (T1 vs T0 -18%; T2 vs T0 +18%; T3 vs T0 +10%; T4 vs T0 -35%).

Esami ematochimici

	Media T0 (n12)	Mediana T0 (n12)	Media T4 (n10)	Mediana T4 (n10)
Emoglobina g/l	142,6	144	134,9	138,5
Ematocrito %	37	40	40	42
Piastrine mila/mcl	260,2	258,5	245,4	238
Reticolociti %	0,84	0,81	0,96	0,95
Reticolociti 10 ⁹ /l	40,34	40,9	46,8	43,7
Colesterolo tot mg/dl	194	197	178,7	172
HDL mg/dl	64,1	61	66,9	65
LDL mg/dl	96,2	99	92,1	87,5
Urea mg/dl	37,8	41	32,6	31,5
Creatinina mg/dl	0,91	0,9	0,93	0,95

Tab.6 valori degli esami ematochimici al T0 (pre-intervento) e T4 (post-intervento)

Premesso che non vi sono variazioni statisticamente significative nei parametri ematochimici misurati e che la numerosità campionaria è ridotta, si nota una lieve riduzione media dei valori di Hb a T4 rispetto a T0, con un aumento dell'ematocrito. I reticulociti sembrano lievemente aumentati a T4. I livelli totali di colesterolo mostrano una tendenza a diminuire a T4, soprattutto nella componente LDL. I livelli plasmatici di creatinina sembrano stabili, mentre l'urea tende a calare a T4.

Discussione

Ben conosciuti i protocolli ipossici per il miglioramento della prestazione in atleti, così come la somministrazione di miscele iperossiche nel periodo di recupero, si indaga il ruolo delle miscele ipo/iperossiche intermittenti associate ad esercizio fisico. Alla luce di

questa sperimentazione sul dispositivo OX2 Master® con miscele intermittenti IHHT di ossigeno, si evince che il nuovo dispositivo, così come si presenta, eroga in maniera sicura ed efficace le miscele suggerite.

Come dimostrato dai parametri di 8-iso PGF2 α e IL-6, che aumentano in modo esponenziale preferenzialmente per il protocollo training, in modo meno lampante per il gruppo conditioning, l'IHHT ha stimolato un grado di stress ossidativo e infiammazione crescente nel corso dell'adattamento del corpo allo stimolo ipossico/iperossico nel corso della totale somministrazione del protocollo.

Possiamo concludere dai parametri di infiammazione che l'allenamento non è riuscito a stimolare una risposta antiossidante sufficiente, probabilmente perché l'intervento è stato troppo breve per indurre un adattamento antiossidante. L'andamento del gruppo conditioning presenta invece un andamento incostante, ma che arriva infine alla stessa conclusione di decremento della TAC rispetto al valore al T0. Anche questo risultato può essere ricondotto alla durata troppo breve dell'intervento.

Il cambiamento in termini di creatinina può derivare da varie cause tra cui: un aumento della massa muscolare (IHHT può promuovere la sintesi proteica attraverso un aumento della disponibilità di ossigeno e l'attivazione di vie metaboliche), una maggiore richiesta energetica (con un metabolismo più elevato, l'uso di creatina nei muscoli aumenta, risultando in un incremento della creatinina), stress fisiologico (l'esercizio intenso può causare una lieve alterazione nella funzionalità renale, risultando in un aumento della creatinina), variazioni nell'idratazione (la disidratazione può concentrare la creatinina nel sangue, causando un apparente aumento dei suoi livelli) o compromissione temporanea della funzionalità renale. (95)

L'aumento dell'acido urico è invece probabilmente imputabile a:

- Aumento del metabolismo energetico: durante le prime fasi di un protocollo IHHT, il corpo può aumentare il metabolismo energetico per adattarsi agli stressors dell'allenamento;
- Risposta fisiologica all'allenamento: l'allenamento intermittente può provocare stress ossidativo e infiammazione, entrambi fattori che possono contribuire a un aumento temporaneo dei livelli di acido urico.

Con il progredire del protocollo IHHT però, l'organismo può adattarsi meglio all'allenamento, migliorando la sua capacità di metabolizzare le purine e gestire l'acido urico. Ciò può portare a una diminuzione dei livelli di acido urico dopo un iniziale aumento.

Inoltre, dopo le fasi iniziali di stress, il miglioramento della funzionalità renale e dell'efficienza nel filtrare e rimuovere l'acido urico dal sangue può contribuire a una diminuzione dei livelli di acido urico. Ciò perché l'allenamento regolare può anche migliorare la circolazione e la funzionalità renale nel lungo termine. (96)

Per quanto riguarda i parametri ematochimici, primariamente si può notare una diminuzione del valore totale dell'emoglobina. Questo cambiamento potrebbe apparire controintuitivo, dato che l'ipossia in genere stimola la produzione di eritropoietina (EPO), che promuove la produzione di globuli rossi. Tuttavia, la diminuzione dell'emoglobina potrebbe essere spiegata da:

- diluizione ematica: Aumentando il volume plasmatico in risposta all'allenamento, la concentrazione di emoglobina potrebbe ridursi, anche se il numero totale di globuli rossi rimane invariato o aumenta.
- bilancio tra ipossia e iperossia: L'elemento iperossico del protocollo potrebbe aver ridotto la necessità di aumentare la produzione di emoglobina per compensare l'ipossia.

(97)

L'ematocrito, che misura la percentuale di sangue costituita da globuli rossi, è aumentato in seguito al protocollo di 4 settimane. Il suo aumento, insieme a un'emoglobina ridotta, potrebbe indicare un aumento del volume totale di globuli rossi, ma con una maggiore diluizione del plasma. Questo è coerente con un aumento della produzione di globuli rossi indotta dall'ipossia (stimolo eritropoietico), che contribuisce a migliorare la capacità di trasporto dell'ossigeno. L'aumento dell'ematocrito è spesso un segno di adattamento all'ipossia, poiché l'organismo cerca di compensare la bassa disponibilità di ossigeno aumentando la densità dei globuli rossi. (98)

La diminuzione delle piastrine può invece essere legata a diversi fattori, tra cui l'effetto dell'allenamento (l'aumento dell'ematocrito è spesso un segno di adattamento all'ipossia,

poiché l'organismo cerca di compensare la bassa disponibilità di ossigeno aumentando la densità dei globuli rossi.) e l'adattamento vascolare (una riduzione delle piastrine può anche riflettere un miglioramento dell'efficienza circolatoria e un minor fabbisogno di aggregazione piastrinica.). (99)

I reticolociti sono globuli rossi immaturi rilasciati dal midollo osseo. Un aumento del loro numero indica una stimolazione dell'eritropoiesi (produzione di globuli rossi), probabilmente indotta dall'ipossia intermittente durante l'IHHT. Questo aumento suggerisce che l'organismo sta attivamente producendo più globuli rossi in risposta all'ipossia, cercando di migliorare la capacità di trasporto dell'ossigeno. (100)

L'IHHT ha dimostrato infine di migliorare il profilo lipidico. La diminuzione del colesterolo totale e delle LDL, insieme all'aumento delle HDL, è un segno positivo che riflette un miglioramento della salute cardiovascolare.

Da quanto si evince, i risultati ottenuti dalla fase di sperimentazione e di analisi dei dati del progetto effettuato vanno a confermare e dare rilevanza agli studi precedentemente svolti nel campo dell'allenamento intermittente con somministrazioni di dosi ipo/iperossiche (IHHT). Ne è infatti risultato una stimolazione della risposta ossidante e auspicabilmente di quella antiossidante; un miglioramento dello sforzo percepito tramite la scala BORG; un alto grado di sicurezza del protocollo in quanto per nessun soggetto si sono verificati sintomi AMS; nessun sintomo che porta ad interruzione di protocollo anche sotto sforzo e infine una grande facilità di esecuzione del protocollo e utilizzo del macchinario OX2 Master®, il che assicura una buona percentuale di ripetibilità.

Nonostante ciò, è necessario specificare alcuni limiti riscontrati in ultima analisi: la poca numerosità di soggetti, sarebbe infatti necessario aumentare la numerosità campionaria. Sono stati, inoltre, presi in esame solo soggetti sani senza patologie. Il protocollo andrebbe verificato anche sui potenziali beneficiari finali come atleti di endurance professionisti o alpinisti e subacquei. Infine, lo sforzo non è stato perfettamente standardizzato. È necessario un monitoraggio più preciso di frequenza e potenza espresse con treadmill e una misurazione oggettiva di un eventuale miglioramento della performance.

Rimane quindi aperta la sfida nel trovare la giusta dose ipo/iperossica che dia la risposta adattativa atta a stimolare tutti gli effetti benefici visti in precedenza, dose che non conduca a rischi per la salute, generando la cosiddetta dose tossica.

Questo studio pone le basi per un approfondimento necessario che vada ad indagare i limiti della somministrazione del dosaggio di ossigeno. Nel campo dell'allenamento si suggerisce una ricerca più dettagliata per quanto riguarda i protocolli d'esercizio, in quanto nella letteratura scientifica sono presenti soltanto poche evidenze che vadano a definire una regola sulla somministrazione di specifici protocolli. Una definizione dei limiti di somministrazione ipo/iperossica è necessaria, in primo luogo, per evitare effetti dose-risposta pericolosi per l'organismo e, secondariamente, per promuovere e sfruttare queste risorse per portare il livello prestativo degli atleti mondiali su uno step superiore, promuovendo non solo i loro risultati prestativi, ma ponendo l'attenzione sulla loro fitness e il loro recupero post-prestativo. Un side effect di dare ascolto alla salute fisica dell'atleta attraverso tutti gli accorgimenti possibili, tra cui un recupero adeguato dopo un ingente sforzo muscolare, anche grazie ad un allenamento rivisitato attraverso la somministrazione di ossigeno, può costruire atleti non solo robusti a livello prestativo, ma anche puntando ad una valorizzazione alla longevità agli alti livelli competitivi.

La strada nel settore è sicuramente ancora lunga prima di arrivare all'obiettivo di definire in modo saldo quali sono i protocolli d'esercizio maggiormente adatti ad ogni singolo caso sport specifico e quali sono le dosi maggiormente raccomandate per determinare in completa sicurezza quegli effetti benefici, che oramai sono ritenuti associati dalla letteratura scientifica attualmente convalidata. Nonostante ciò, visti questi risultati promettenti, la ricerca mondiale sembra intenta a svolgere maggiori approfondimenti con l'intenzione di esaminare questi temi con una prospettiva rinnovata e uno spirito di indagine approfondita, con l'obiettivo di raggiungere conclusioni più definitive e fondate.

Conclusioni

In conclusione, possiamo affermare che i protocolli di IHHT proposti in questo studio si sono dimostrati sicuri e minimamente impattanti sulla sintomatologia ipossica. Hanno indotto un miglioramento della performance espressa a livello soggettivo e misurata con

scala di Borg. Inoltre, si è potuto descrivere uno sbilanciamento dell'equilibrio verso uno stato ossidativo, uno stato pro-infiammatorio più spiccato nel protocollo training e il mantenimento della funzionalità renale. Variazioni ematochimiche a livello plasmatico devono essere confermate aumentando la numerosità campionaria e variando il campione di soggetti includendo anche soggetti sportivi e quantificando meglio il carico di esercizio e la performance fisica. Questo studio pilota apre le porte ad ulteriori approfondimenti.

Bibliografia e Sitografia

1. Zhou, B., et al. (2015). "Intermittent Hypoxia and Hyperoxia Training in Healthy and Clinical Populations." *Frontiers in Physiology*, 6, 1-12. DOI: 10.3389/fphys.2015.00120.
2. Bishop, D. J., & Jones, E. (2002). "The Effect of Altitude Training on Exercise Performance." *Sports Medicine*, 32(1), 51-63. DOI: 10.2165/00007256-200232010-00004.
3. Bourdon, P. C., et al. (2017). "The Role of Reactive Oxygen Species in Exercise-Induced Adaptations." *Journal of Physiology*, 595(14), 4361-4372. DOI: 10.1113/JP274580.
4. Harrison, M. H., & Barnett, A. (2015). "Physiological Effects of Hyperoxic Exposure on Human Performance." *Journal of Applied Physiology*, 118(2), 186-194. DOI: 10.1152/jappphysiol.00895.2014.
5. Manukhina, E. B., et al. (2012). "Adaptation of the Cardiovascular System to Intermittent Hypoxic and Hyperoxic Training." *Biology of Sport*, 29(3), 177-185.
6. Meyer, F., et al. (2015). "Hypoxia-Induced Adaptations and Their Applications in Sports Medicine." *European Journal of Applied Physiology*, 115(1), 1-15. DOI: 10.1007/s00421-014-2846-7.
7. "Fisiologia umana – fondamenti", 2018 Edi-ermes s.r.l. – Milano
8. [https://nursetimes.org/la-valutazione-del-microcircolo-e-dei-microparametri-nellasepsi/131623#:~:text=La%20DO2%20\(Delivery%20di%20O2,%2B%20\(PaO2%20x%200%2C003](https://nursetimes.org/la-valutazione-del-microcircolo-e-dei-microparametri-nellasepsi/131623#:~:text=La%20DO2%20(Delivery%20di%20O2,%2B%20(PaO2%20x%200%2C003)
9. Fick, A. (1870) Über die messung des Blutquantums in den Hertzventrikeln. *Sitzber Physik Med Ges Wurzburg* July 9th, 36.
10. Burtcher J. Mechanisms underlying the health benefits of intermittent hypoxia conditioning. *J Physiol*. 2023 Oct 20. doi: 10.1113/JP285230. Epub ahead of print. PMID: 37860950.

11. Burtcher, Johannes & Citherlet, Tom & Camacho-Cardenosa, Alba & Camacho-Cardenosa, Marta & Antoine, Raberin & Krumm, Bastien & Hohenauer, Erich & Egg, Margit & Müller, Julian & Rybnikova, Elena & Gatterer, Hannes & Debevec, Tadej & Sébastien, Baillieul & Manferdelli, Giorgio & Behrendt, Tom & Schega, Lutz & Ehrenreich, Hannelore & Millet, Gregoire & Gassmann, Max & Mallet, Robert. (2023). Mechanisms underlying the health benefits of intermittent hypoxia conditioning. *The Journal of Physiology*. 1-27. 10.1113/JP285230.
12. *Exercise Physiology: Nutrition, Energy, and Human Performance*, Point (Lippincott Williams & Wilkins) Wolters Kluwer Health, William D. McArdle, Frank I. Katch, Victor L. Katch, Lippincott Williams & Wilkins, 2010
13. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997 Mar;82(2):291-5. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024. PMID: 9129943.
14. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012 Feb 3;148(3):399-408. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.021. PMID: 22304911; PMCID: PMC3437543.
15. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997 Mar;82(2):291-5. doi: 10.1113/expphysiol.1997.sp004024. PMID: 9129943.
16. Kaelin, W. G. Jr., Ratcliffe, P. J., & Semenza, G. L. (2019). The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019: Hypoxia-inducible factors and their role in health and disease. *Nobel Prize Press Release*. Retrieved from nobelprize.org.
17. Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408.
18. Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*, 148(3), 399-408.
19. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011 Dec 15;12(1):9-22. doi: 10.1038/nrc3183. PMID: 22169972; PMCID: PMC3401912.
20. Mole DR, Blancher C, Copley RR, Pollard PJ, Gleadle JM, Ragoussis J, Ratcliffe PJ. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J Biol Chem*. 2009 Jun 19;284(25):16767-16775. doi: 10.1074/jbc.M901790200. Epub 2009 Apr 21. PMID: 19386601; PMCID: PMC2719312.
21. Zhang Q, Yan Q, Yang H, Wei W. Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Genes Dis*. 2019 Oct 19;6(4):328-332. doi: 10.1016/j.gendis.2019.10.006. PMID: 31832511; PMCID: PMC6889041.

22. Troise, D.; Infante, B.; Mercuri, S.; Netti, G.S.; Ranieri, E.; Gesualdo, L.; Stallone, G.; Pontrelli, P. Hypoxic State of Cells and Immunosenescence: A Focus on the Role of the HIF Signaling Pathway. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2163. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082163>
23. Xin, Y., Zhao, L. & Peng, R. HIF-1 signaling: an emerging mechanism for mitochondrial dynamics. *J Physiol Biochem* **79**, 489–500 (2023). <https://doi.org/10.1007/s13105-023-00966-0>
24. Iturriaga R, Alcayaga J, Chapleau MW, Somers VK. Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiol Rev.* 2021 Jul 1;101(3):1177-1235. doi: 10.1152/physrev.00039.2019. Epub 2021 Feb 11. PMID: 33570461; PMCID: PMC8526340.
25. Teppema, L.J. and Dahan, A. (2010) The ventilatory response to hypoxia in mammals: Mechanisms, measurement, and analysis. *Physiology Reviews*, 90, 675-754. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00012.2009>
26. Menuet C, Connelly AA, Bassi JK, Melo MR, Le S, Kamar J, Kumar NN, McDougall SJ, McMullan S, Allen AM. PreBötzing complex neurons drive respiratory modulation of blood pressure and heart rate. *Elife.* 2020 Jun 15;9:e57288. doi: 10.7554/eLife.57288. PMID: 32538785; PMCID: PMC7326498.
27. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:47-71. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104720. Epub 2013 Aug 7. PMID: 23937437.
28. Xin Yi et al. ,Sequencing of 50 Human Exomes Reveals Adaptation to High Altitude.Science329,75-78(2010).DOI:10.1126/science.1190371
29. Human adaptation to hypoxia in critical illness, Helen T. McKenna, Andrew J. Murray, and Daniel S. Martin, 28 Sep 2020<https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00818.2019>
30. Mujika, I., Sharma, A.P. & Stellingwerff, T. Contemporary Periodization of Altitude Training for Elite Endurance Athletes: A Narrative Review. *Sports Med* **49**, 1651–1669 (2019). <https://doi.org/10.1007/s40279-019-01165-y>
31. Kouroumalis, E., et al. (2017). "Understanding Hypoxia and Its Implications in Clinical Practice." *Journal of Clinical Medicine*, 6(3), 1-12. DOI: 10.3390/jcm6030036.
32. Esparza-Moltó PB, Romero-Carramiñana I, Núñez de Arenas C, Pereira MP, Blanco N, Pardo B, Bates GR, Sánchez-Castillo C, Artuch R, Murphy MP, Esteban JA, Cuezva JM. Generation of mitochondrial reactive oxygen species is controlled by ATPase inhibitory factor 1 and regulates cognition. *PLoS Biol.* 2021 May 13;19(5):e3001252. doi: 10.1371/journal.pbio.3001252. PMID: 33983919; PMCID: PMC8148373.

33. Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response*. 2014 Jan 31;12(2):288-341. doi: 10.2203/dose-response.13-035.Ristow. PMID: 24910588; PMCID: PMC4036400.
34. Serebrovskaya TV, Nikolsky IS, Nikolska VV, Mallet RT, Ishchuk VA. Intermittent hypoxia mobilizes hematopoietic progenitors and augments cellular and humoral elements of innate immunity in adult men. *High Alt Med Biol*. 2011 Fall;12(3):243-52. doi: 10.1089/ham.2010.1086. PMID: 21962068; PMCID: PMC3186684.
35. Lee et al., 2018;
36. Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Camacho-Cardenosa M, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Casado-Díaz A. Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J Stem Cells*. 2022 Jul 26;14(7):453-472. doi: 10.4252/wjsc.v14.i7.453. PMID: 36157530; PMCID: PMC9350626.
37. Camacho-Cardenosa, A., Camacho-Cardenosa, M., Tomas-Carus, P. *et al*. Acute physiological response to a normobaric hypoxic exposure: sex differences. *Int J Biometeorol* **66**, 1495–1504 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00484-022-02298-y>
38. Timon R, Martinez-Guardado I, Brocherie F. Effects of Intermittent Normobaric Hypoxia on Health-Related Outcomes in Healthy Older Adults: A Systematic Review. *Sports Med Open*. 2023 Feb 26;9(1):19. doi: 10.1186/s40798-023-00560-0. PMID: 36843041; PMCID: PMC9968673.
39. Bartscher J, Mallet RT, Bartscher M, Millet GP. Hypoxia and brain aging: Neurodegeneration or neuroprotection? *Ageing Res Rev*. 2021 Jul;68:101343. doi: 10.1016/j.arr.2021.101343. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33862277.
40. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. 1998 Jan 15;12(2):149-62. doi: 10.1101/gad.12.2.149. PMID: 9436976; PMCID: PMC316445.
41. Bartscher, Johannes & Citherlet, Tom & Camacho-Cardenosa, Alba & Camacho-Cardenosa, Marta & Antoine, Raberin & Krumm, Bastien & Hohenauer, Erich & Egg, Margit & Müller, Julian & Rybnikova, Elena & Gatterer, Hannes & Debevec, Tadej & Sébastien, Baillieul & Manferdelli, Giorgio & Behrendt, Tom & Schega, Lutz & Ehrenreich, Hannelore & Millet, Gregoire & Gassmann, Max & Mallet, Robert. (2023). Mechanisms underlying the health benefits of intermittent hypoxia conditioning. *The Journal of Physiology*. 1-27. 10.1113/JP285230.

42. Burtscher, Johannes & Citherlet, Tom & Camacho-Cardenosa, Alba & Camacho-Cardenosa, Marta & Antoine, Raberin & Krumm, Bastien & Hohenauer, Erich & Egg, Margit & Müller, Julian & Rybnikova, Elena & Gatterer, Hannes & Debevec, Tadej & Sébastien, Baillieul & Manferdelli, Giorgio & Behrendt, Tom & Schega, Lutz & Ehrenreich, Hannelore & Millet, Gregoire & Gassmann, Max & Mallet, Robert. (2023). Mechanisms underlying the health benefits of intermittent hypoxia conditioning. *The Journal of Physiology*. 1-27. 10.1113/JP285230.
43. Raberin A, Burtscher J, Connes P, Millet GP. Hypoxia and hemorheological properties in older individuals. *Ageing Res Rev*. 2022 Aug;79:101650. doi: 10.1016/j.arr.2022.101650. Epub 2022 May 18. PMID: 35597435.
44. Johannes Burtscher, Robert T. Mallet, Vincent Pialoux, Gre' goire P. Millet, and Martin Burtscher. Adaptive Responses to Hypoxia and/or Hyperoxia in Humans. 2022. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING Volume 00, Number 00, 2022 ^a Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/ars.2021.0280
45. Siebenmann C, Robach P, Jacobs RA, Rasmussen P, Nordsborg N, Diaz V, Christ A, Olsen NV, Maggiorini M, Lundby C. "Live high-train low" using normobaric hypoxia: a double-blinded, placebo-controlled study. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Jan;112(1):106-17. doi: 10.1152/jappphysiol.00388.2011. Epub 2011 Oct 27. PMID: 22033534.
46. Siebenmann C, Robach P, Jacobs RA, Rasmussen P, Nordsborg N, Diaz V, Christ A, Olsen NV, Maggiorini M, Lundby C. "Live high-train low" using normobaric hypoxia: a double-blinded, placebo-controlled study. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Jan;112(1):106-17. doi: 10.1152/jappphysiol.00388.2011. Epub 2011 Oct 27. PMID: 22033534.
47. Burtscher M, Pachinger O, Ehrenbourg I, Mitterbauer G, Faulhaber M, Pühringer R, Tkatchouk E. Intermittent hypoxia increases exercise tolerance in elderly men with and without coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2004 Aug;96(2):247-54. doi: 10.1016/j.ijcard.2003.07.021. PMID: 15262041.
48. Diebold I, Petry A, Hess J, Görlach A. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Mol Biol Cell*. 2010 Jun 15;21(12):2087-96. doi: 10.1091/mbc.e09-12-1003. Epub 2010 Apr 28. PMID: 20427574; PMCID: PMC2883952.
49. Yong Yuan, Bo Zhao, Shungui Zhou, Shengkui Zhong, Li Zhuang, Electrocatalytic activity of anodic biofilm responses to pH changes in microbial fuel cells, *Bioresource Technology*, Volume 102, Issue 13, 2011, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.008>.
50. Li et al., 2018
51. Butt et al., 2021;

52. Ehrenreich H, Gassmann M, Poustka L, et al. Exploiting moderate hypoxia to benefit patients with brain disease: molecular mechanisms and translational research in progress. *Neuroprotection*. 2023; 1: 55-65. [doi:10.1002/nep3.15](https://doi.org/10.1002/nep3.15)
53. Wakhloo, D., Scharkowski, F., Curto, Y. *et al.* Functional hypoxia drives neuroplasticity and neurogenesis via brain erythropoietin. *Nat Commun* **11**, 1313 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15041-1>
54. Burtscher J. Mechanisms underlying the health benefits of intermittent hypoxia conditioning. *J Physiol*. 2023 Oct 20. doi: 10.1113/JP285230. Epub ahead of print. PMID: 37860950.
55. Balestra, C.; Kot, J. Oxygen: A Stimulus, Not “Only” a Drug. *Medicina* **2021**, *57*, 1161. <https://doi.org/10.3390/medicina57111161>
56. Balestra, C.; Kot, J. Oxygen: A Stimulus, Not “Only” a Drug. *Medicina* **2021**, *57*, 1161. <https://doi.org/10.3390/medicina57111161>
57. Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med*. 2014 May-Jun;41(3):247-52. PMID: 24984320.
58. Camporesi EM. Side effects of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med*. 2014 May-Jun;41(3):253-7. PMID: 24984321.
59. Singer, M., Young, P.J., Laffey, J.G. *et al.* Dangers of hyperoxia. *Crit Care* **25**, 440 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03815-y>
60. Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Jan;127 Suppl 1(Suppl 1):131S-141S. doi: 10.1097/PRS.0b013e3181f8e2bf. PMID: 21200283; PMCID: PMC3058327.
61. Bitterman H. Bench-to-bedside review: oxygen as a drug. *Crit Care*. 2009;13(1):205. doi: 10.1186/cc7151. Epub 2009 Feb 24. PMID: 19291278; PMCID: PMC2688103.
62. Thomson AJ, Drummond GB, Waring WS, Webb DJ, Maxwell SR. Effects of short-term isocapnic hyperoxia and hypoxia on cardiovascular function. *J Appl Physiol* (1985). 2006 Sep;101(3):809-16. doi: 10.1152/jappphysiol.01185.2005. PMID: 16902069.
63. Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G. Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis*. 1996 Nov;11(6):605-9. doi: 10.1093/mutage/11.6.605. PMID: 8962431.
64. Agnieszka Loboda, Alicja Jozkowicz, Jozef Dulak, HIF-1 and HIF-2 Transcription Factors - Similar but Not Identical, *Molecules and Cells*, Volume 29, Issue 5, 2010, Pages 435-442, ISSN 1016-8478, <https://doi.org/10.1007/s10059-010-0067-2>.
65. Balestra, C.; Kot, J. Oxygen: A Stimulus, Not “Only” a Drug. *Medicina* **2021**, *57*, 1161. <https://doi.org/10.3390/medicina57111161>

66. Balestra, C.; Kot, J. Oxygen: A Stimulus, Not “Only” a Drug. *Medicina* **2021**, *57*, 1161. <https://doi.org/10.3390/medicina57111161>
67. Song, D., et al. (2023)
68. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013;53:401-26. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320. PMID: 23294312; PMCID: PMC4680839.
69. Bulat, T., et al. (2022)
70. Seitz H, Preissler E, Catalá-Lehnen P, Weitzl M. Effects of the ‘live low-train high‘ method on variables of endurance capacity. A systematic review. *Dtsch Z Sportmed.* 2020; 71: 43-50. doi:10.5960/dzsm.2019.413
71. Seitz H, Preissler E, Catalá-Lehnen P, Weitzl M. Effects of the ‘live low-train high‘ method on variables of endurance capacity. A systematic review. *Dtsch Z Sportmed.* 2020; 71: 43-50. doi:10.5960/dzsm.2019.413
72. Millet GP, Brocherie F. Hypoxic Training Is Beneficial in Elite Athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2020 Feb;52(2):515-518. doi: 10.1249/MSS.0000000000002142. PMID: 31939914.
73. Brocherie F, Millet GP, Hauser A, Steiner T, Rysman J, Wehrli JP, Girard O. "Live High-Train Low and High" Hypoxic Training Improves Team-Sport Performance. *Med Sci Sports Exerc.* 2015 Oct;47(10):2140-9. doi: 10.1249/MSS.0000000000000630. PMID: 25668402.
74. Arriell RA, de Souza HLR, da Mota GR, Marocolo M. Declines in exercise performance are prevented 24 hours after post-exercise ischemic conditioning in amateur cyclists. *PLoS One.* 2018 Nov 9;13(11):e0207053. doi: 10.1371/journal.pone.0207053. PMID: 30412606; PMCID: PMC6226188.
75. Girard O, Brocherie F, Goods PSR, Millet GP. An Updated Panorama of "Living Low-Training High" Altitude/Hypoxic Methods. *Front Sports Act Living.* 2020 Mar 31;2:26. doi: 10.3389/fspor.2020.00026. PMID: 33345020; PMCID: PMC7739748.
76. Behrendt, T., Bielitzki, R., Behrens, M. *et al.* Effects of Intermittent Hypoxia–Hyperoxia on Performance- and Health-Related Outcomes in Humans: A Systematic Review. *Sports Med - Open* **8**, 70 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40798-022-00450-x>
77. Behrendt, T., Bielitzki, R., Behrens, M. *et al.* Effects of Intermittent Hypoxia–Hyperoxia on Performance- and Health-Related Outcomes in Humans: A Systematic Review. *Sports Med - Open* **8**, 70 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40798-022-00450-x>

78. Behrendt, T., Bielitzki, R., Behrens, M. *et al.* Effects of Intermittent Hypoxia–Hyperoxia on Performance- and Health-Related Outcomes in Humans: A Systematic Review. *Sports Med - Open* **8**, 70 (2022). <https://doi.org/10.1186/s40798-022-00450-x>
79. Faiss R, Girard O, Millet GP. Advancing hypoxic training in team sports: from intermittent hypoxic training to repeated sprint training in hypoxia. *Br J Sports Med.* 2013 Dec;47 Suppl 1(Suppl 1):i45-50. doi: 10.1136/bjsports-2013-092741. PMID: 24282207; PMCID: PMC3903143.
80. Mathieu D, Marroni A, Kot J. Tenth European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine: recommendations for accepted and non-accepted clinical indications and practice of hyperbaric oxygen treatment. *Diving Hyperb Med.* 2017 Mar;47(1):24-32. doi: 10.28920/dhm47.1.24-32. Erratum in: *Diving Hyperb Med.* 2017 Jun;47(2):131-132. doi: 10.28920/dhm47.2.131-132. PMID: 28357821; PMCID: PMC6147240.
81. Moon RE, Sheffield PJ. Guidelines for treatment of decompression illness. *Aviat Space Environ Med.* 1997 Mar;68(3):234-43. PMID: 9056035.
82. Vann RD, Butler FK, Mitchell SJ, Moon RE. Decompression illness. *Lancet.* 2011 Jan 8;377(9760):153-64. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61085-9. PMID: 21215883.
83. Millet, G. P., & Debevec, T. (2014). Hypoxic conditioning as a new frontier in athletic training: a primer for altitude training and intermittent hypoxic training. *Sports Medicine*, 44(8), 1115-1123)
84. Davis, Jeffrey R., Robert Johnson, and Jan Stepanek, eds. *Fundamentals of aerospace medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
85. Barratt, M.R. & Pool, S.L.. (2008). Principles of Clinical Medicine for Space Flight. 10.1007/978-0-387-68164-1.
86. Bosco, G.; Paganini, M.; Giacon, T.A.; Oppio, A.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Moro, T.; Paoli, A.; Zanotti, F.; Zavan, B.; et al. Oxidative Stress and Inflammation, MicroRNA, and Hemoglobin Variations after Administration of Oxygen at Different Pressures and Concentrations: A Randomized Trial. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 9755. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189755>
87. Roach RC, Hackett PH, Oelz O, Bärtsch P, Luks AM, MacInnis MJ, Baillie JK; Lake Louise AMS Score Consensus Committee. The 2018 Lake Louise Acute Mountain Sickness Score. *High Alt Med Biol.* 2018 Mar;19(1):4-6. doi: 10.1089/ham.2017.0164. Epub 2018 Mar 13. PMID: 29583031; PMCID: PMC6191821.
88. Serafini, M., & Del Rio, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report*, 9(3), 145-152.

89. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312-322.
90. Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature Immunology*, 16(5), 448-457
91. Montuschi, P., Barnes, P. J., & Roberts, L. J. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB Journal*, 18(15), 1791-1800
92. Ignarro, L. J. (1991). Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Science*, 258(5090), 1863-1866.
93. Ischiropoulos, H. (1998). Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(3), 461-466.
94. Poortmans, J. R., & Francaux, M. (1999). Long-term oral creatine supplementation does not impair renal function in healthy athletes. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 31(8), 1108-1110.
95. Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B., & Fuchs, D. (2002). Neopterin as a marker for immune system activation. *Current Drug Metabolism*, 3(2), 175-187
96. Maiuolo, J., Oppedisano, F., Gratteri, S., Muscoli, C., & Mollace, V. (2016). Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8-14.
97. Heinicke, K., Wolfarth, B., Winchenbach, P., Biermann, B., Schmid, A., Huber, G., & Schmidt, W. (2001). Blood volume and hemoglobin mass in elite athletes of different disciplines. *International Journal of Sports Medicine*, 22(7), 504-512.
98. Lundby, C., & Robach, P. (2015). Performance enhancement: what are the physiological limits? *Physiology*, 30(4), 282-292.
99. Lippi, G., & Banfi, G. (2010). Blood platelet count and volume in athletes: is it really decreased? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 48(5), 677-679.
100. Mairbäurl, H. (2013). Red blood cells in sports: effects of exercise and training on oxygen supply by red blood cells. *Frontiers in Physiology*, 4, 332.