

---

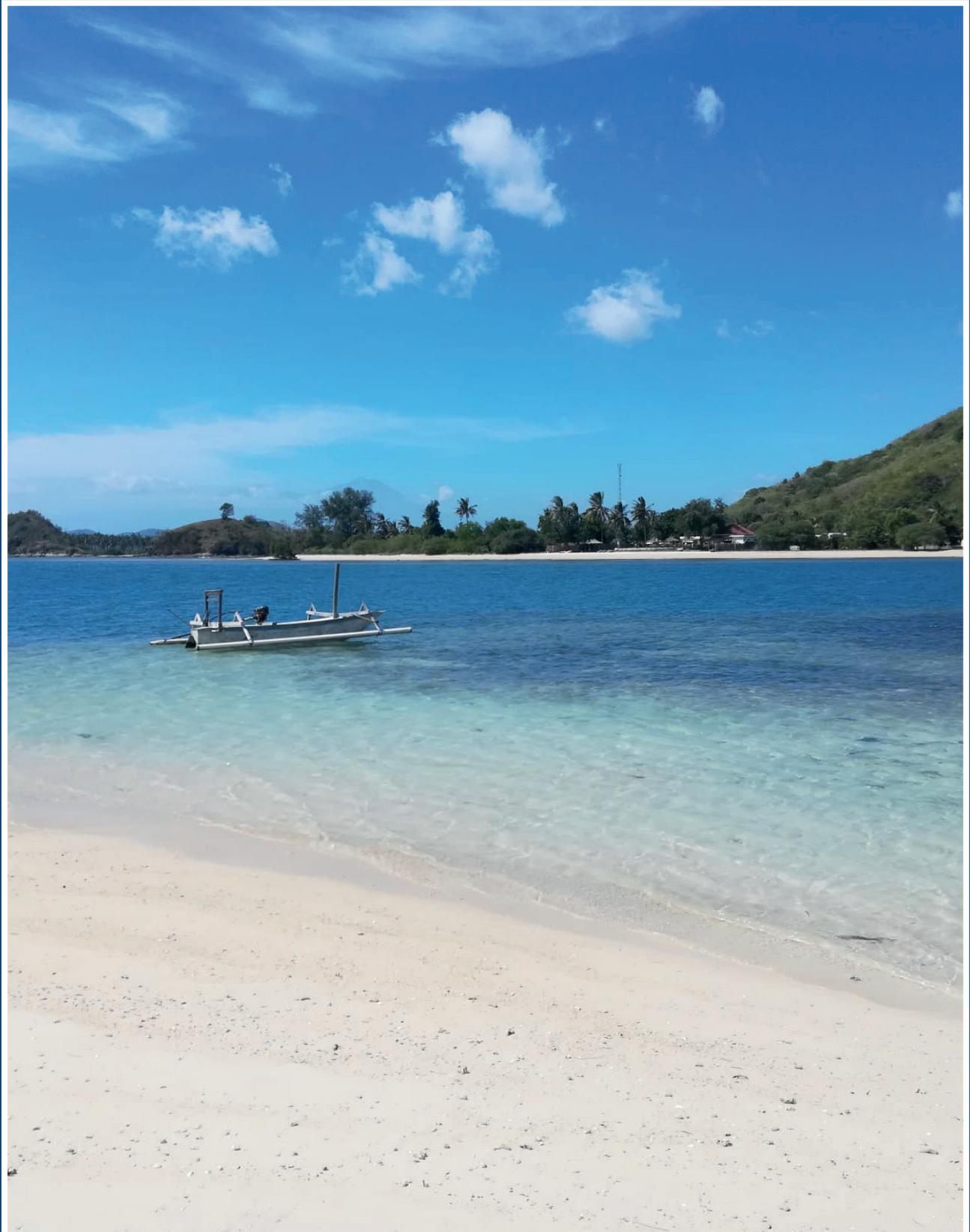
# GIORNALE ITALIANO OZONO TERAPIA & House Organ Nuova FIO

WFOT - World Federation of Ozone Therapy - Nuova FIO - New Italian Federation of Ozone Therapy

---

No. 5 - Luglio 2019

---





---

# GIORNALE ITALIANO OZONO TERAPIA & House Organ Nuova FIO

WFOT - World Federation of Ozone Therapy - Nuova FIO - New Italian Federation of Ozone Therapy

---

No. 5 - Luglio 2019

---

## Index

### ■ Articoli

Uso di fattori di crescita attivati con ozono e cellule CD34<sup>+</sup> incorporati in un gel di albumina, applicati in medicina estetica: un caso clinico 3  
*Paola Pederzoli*

Effects of Systemic Ozone Therapy on Plethysmographic and Impedance Parameters 13  
*Chiara Cusa, Gregorio Martínez-Sánchez, Elena Mainardi, Claudia Casarini, Danilo Miotti*

Cistiti ricorrenti nella donna: utilizzo dell'ozonoterapia locale 23  
*Paolo Bisetti*

Percutaneous Ozone Treatment for Herniated Lumbar Discs: 1-Year Follow-up of a Multicenter Pilot Study of a Handheld Disposable Ozone-Generating Device. Clinical Study 27  
*Anuj Bhatia, Peter Munk, Donald Lee, Gavin Elias, Kieran Murphy*

### ■ Nuova FIO

Comitato direttivo - Comitato scientifico - Sedi regionali 39

Atto costitutivo 42

Progetto Ozono 43  
*Maurizio Martinelli*

Subscription 44

■ Corsi e Congressi 2, 12, 37, 38

**I Annuncio**



**NUOVA**  
**FEDERAZIONE ITALIANA**  
**DI OSSIGENO-OZONO**

Società scientifica riconosciuta dal Ministero della Salute  
ai sensi della L. 8 marzo 2017, n. 24



**18-19 settembre**  
**2020**

**Assemblea dei Soci**  
**Nuova FIO**

**PALACONGRESSI**  
**RIMINI**

**Via della Fiera, 23**  
**47923 Rimini (RN)**

Provider ECM:



**X-Ray Service**

Per informazioni:  
[formazione@xray-service.it](mailto:formazione@xray-service.it)  
+39 030 3701312

# Uso di fattori di crescita attivati con ozono e cellule CD34<sup>+</sup> incorporati in un gel di albumina, applicati in medicina estetica: un caso clinico

PAOLA PEDERZOLI

*Clinica Nuova Ricerca, Rimini; Scientific research for Silfradent, Forlì, Italy*

**Key words:** CGF, CD34<sup>+</sup>, PRPO<sub>3</sub>

**ABSTRACT** - *Lo scopo di questa ricerca è stato quello di dimostrare l'importanza dei Fattori di Crescita associati all'Ozono nella rigenerazione cellulare là dove i trattamenti più conosciuti falliscono o possono creare danni permanenti. Nel nostro caso si tratta di sfregio con gravi conseguenze medico legali. Il CGF attivato con ozono, agisce come stimolante sull'attivazione dei fibroblasti e quindi sulla produzione di nuovo collagene ed elastina in modo fisiologico.*

## Introduzione

La letteratura internazionale documenta l'efficacia clinica dell'ozono in un ampio numero di patologie e dimostra i possibili meccanismi di azione dell'ozono. L'ozono è un potente pro-ossidante in grado di indurre la produzione di radicali liberi altamente reattivi che promuovono un pre-condizionamento ossidativo capace a sua volta di ridurre i marcatori di stress ossidativo e incrementare la riserva del sistema di difesa antiossidante tissutale<sup>1-4</sup>.

L'ozono, quindi si comporta come un pro-farmaco che, direttamente o tramite i suoi metaboliti, stimola il riequilibrio del sistema REDOX, migliora la cessione di ossigeno ai tessuti, la perfusione del microcircolo e induce la rimozione di cataboliti tossici e la neoformazione di piccoli vasi. Nell'organismo umano l'ozono viene naturalmente prodotto ad opera dei neutrofilii attivati per aumentarne le capacità difensive<sup>5</sup>.

In condizioni patologiche, nel processo di invecchiamento, e in condizioni di sovraccarico da stress vengono invece cronicamente prodotti un eccesso di radicali liberi (radicali superossidi) capaci di danneggiare le membrane fosfolipidiche e alterare i processi delle membrane cellulari e l'attività mitocondriale con conseguente insufficiente detossificazione dei composti reattivi e facilitazione di sviluppo e la progressione di patologie degenerative<sup>6,7</sup>.

L'ozono ha un effetto importante come attivatore del rilascio di fattori di crescita piastrinici<sup>8,9</sup>.

L'ozono aumenta il rilascio di fattori piastrinici come il fattore stimolante di fibroblasti<sup>10</sup>, per tanto risulta d'interesse la sua applicazione nel ambito estetico<sup>11</sup>. Il granuloma per l'uso di filler a base de acido ialuronico e una problematica frequente in medicina estetica. La correzione di questa tipologia di granuloma implica l'uso di ialuronidasi e LASER, ma entrambi lasciano traumi ai tessuti.

## Obiettivo Primario

Lo scopo dello studio è stato quello di segnalare un caso di una donna da 53 anni, bianca con lesioni traumatiche in entrambi zigomi dopo la reazione granulomatosa all'acido ialuronico trattato con ialuronidasi e LASER, e sottoposta alla ricostruzione rigenerativa utilizzando concentrato autologo di piastrine (CGF) attivato con ozono.

## I Concentrati di fattori di crescita

Il CGF autologo è sostanzialmente una nuova biotecnologia di autoinnesto che ha dimostrato risultati promettenti nella stimolazione e nell'accelerazione dei tessuti molli e nella guarigione e formazione di tessuto osseo. L'efficacia di questo trattamento consiste nell'erogazione locale di una vasta gamma di fattori di crescita e proteine, che mimano e sostengono la guarigione fisiologica della ferita, il processo riparativo dei tessuti e la terapia locale di infiltrazione.

Le cellule progenitrici circolanti CD34<sup>+</sup> derivate

da midollo osseo contribuiscono al rimodellamento e alla riparazione nel processo di vascolarizzazione<sup>24</sup>. L'attivazione piastrinica consente l'accesso a fattori di crescita autologhi che, per definizione, non sono né tossici né immunogenici e sono dunque in grado di accelerare i normali processi di rigenerazione ossea. In generale, un gran numero di studi sul PRP (*Platelet-Rich Plasma*, ovvero plasma arricchito in piastrine) dimostrano che esso stimola la proliferazione e la differenziazione di fibroblasti, osteoblasti, condrociti e cellule staminali mesenchimali<sup>25,26</sup>.

Il PRP può quindi essere considerato un utile strumento per arricchire la qualità del tessuto osseo rigenerato<sup>27</sup>, la guarigione delle ferite, la guarigione di imperfezioni<sup>28</sup> nei tessuti molli associate a lesioni croniche del tendine che non guariscono, tra cui epicondilita laterale, fascite plantare e degenerazione della cartilagine<sup>25</sup>.

Il concentrato di fattori di crescita (*Concentrated Growth Factors* - CGF) è un prodotto autologo che raccoglie in un piccolo volume di plasma un gran numero di fattori di crescita oltre alle cellule staminali CD34<sup>+</sup>. Il sangue è una fonte ottimale nella maggior parte delle tecniche di ingegneria tissutale per la guarigione di grandi lesioni. Il CGF (la seconda generazione di PRP) lavora come un adesivo tissutale di fibrina in grado di avere una tenuta emostatica e del tessuto, ma si differenzia dalla colla di fibrina e da altri adesivi tissutali poveri di piastrine perché le sue piastrine possiedono una capacità unica di favorire la guarigione delle ferite e migliorare l'osteogenesi. Il CGF è un agente chirurgico emostatico immediato, biocompatibile, sicuro ed efficace. Il CGF accelera la rigenerazione endoteliale, epiteliale ed epidermica, stimola l'angiogenesi, accresce la sintesi del collagene, favorisce la guarigione dei tessuti molli e duri, riduce le cicatrici cutanee, migliora la risposta emostatica a una lesione, e fa mutare l'inibizione di guarigione di una ferita causata dai glucocorticoidi. L'alta concentrazione di leucociti presente nel CGF aggiunge inoltre un effetto antimicrobico. Inoltre la lipossina A4 rilasciata dalle piastrine conferisce un effetto antinfiammatorio<sup>29</sup>.

Il CGF ha una gamma estremamente ampia di applicazioni per la guarigione clinica: nella chirurgia della testa e del collo; in otorinolaringoiatria; nella chirurgia cardiovascolare; nel campo delle ustioni e della guarigione di ferite in chirurgia orale e maxillo-facciale; in chirurgia estetica e nei disturbi del legamento parodontale.

#### *Meccanismi*

Risposta emostatica a una lesione: l'iniziale risposta vascolare a una lesione comprende il rilascio di fattori che richiamano piastrine subendoteliali

circolanti e attivano le proteine della coagulazione. Le piastrine rispondono aggregandosi e aderendo al sito della lesione, nel quale rilasciano granuli piastrinici contenenti serotonina, trombossano e adenosina, per avviare la coagulazione e la formazione di fibrina. La produzione locale di trombina migliora l'attivazione delle piastrine e la successiva formazione di un tappo emostatico, che riduce ulteriormente il sanguinamento. La produzione di trombina e l'attivazione di piastrine dà avvio inoltre al processo di guarigione delle ferite mediante l'attivazione di cellule trombina-dipendente e angiogenesi piastrine-dipendente. Il CGF riproduce l'ultimo passaggio del sistema a cascata della coagulazione del sangue: la formazione di un coagulo di fibrina.

#### *Concentrati di fattori di crescita*

Il CGF esercita i suoi effetti benefici attraverso la degranolazione dei granuli alfa delle piastrine, che contengono fattori di crescita ritenuti importanti nella fase iniziale di guarigione di una ferita. Quando le piastrine bifasiche presenti nel CGF attivato dalla trombina si aggregano, rilasciano fattori di crescita, insieme ad altre sostanze che servono ad accelerare il processo di guarigione, aumentando così la proliferazione cellulare, la formazione della matrice, la produzione osteoide, la guarigione del tessuto connettivo, l'angiogenesi e la sintesi del collagene. Il primo passo, ossia la secrezione attiva di questi fattori di crescita, principia entro pochi minuti dall'inizio della sequenza di coagulazione, e più del 90 % dei fattori di crescita sono secreti durante la prima ora nei primi 3 giorni. Dopo questo scatto iniziale, in una seconda fase, le diverse piastrine secernono fattori di crescita addizionali per i rimanenti 7 giorni della loro vitalità. Sopraggiungono poi i macrofagi, a causa della crescita vascolare stimolata dalle piastrine, che regolano la guarigione della ferita secernendo alcuni di quegli stessi fattori di crescita addizionali. Il tasso di guarigione della ferita è determinato dalla qualità della concentrazione piastrinica nel coagulo di sangue all'interno dell'innesto o della ferita, il CGF individua e accresce questo numero iniziale.

Il CGF contiene fattori di crescita piastrinici osteoinduttivi autologhi e una matrice fibrinica osteoconduttiva<sup>30</sup>. Nel CGF sono inoltre presenti: cellule TGF- $\beta$ 1, VEGF e CD34<sup>+</sup><sup>31</sup>. L'impiego di CFG porta a un'eccellente guarigione nel caso di lesione ossea di dimensioni critiche *in vivo*<sup>30</sup>, nel caso di perdita di capelli<sup>32</sup>, nella compromissione delle zone periferiche e in caso di ischemia miocardica<sup>33</sup>.

*Esito fisiologico: guarigione delle lesioni*

Studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che CFG può essere vantaggioso e di facile applicazione in chirurgia e in terapia. Il CGF è stato utilizzato in pazienti sottoposti a interventi di chirurgia estetica, tra cui lifting, aumento del seno, riduzioni del seno e nella chirurgia dell'ascensore collo. L'utilizzo di CGF con rendimento emostatico adeguato, nel caso in cui il plasma è povero di piastrine (PPP), è stato applicato anche per creare una tenuta in grado di arrestare il sanguinamento, poiché il PPP contiene più elevate quantità di fibrinogeno, albumina, globuli bianchi, citochine solubili. È stato riportato che il sanguinamento dei capillari si è effettivamente chiuso entro i tre minuti successivi l'applicazione di PRP e PPP. Si è inoltre notato un ulteriore vantaggio nella possibile riduzione dell'uso di elettrocauterizzazione, limitando così il rischio di danni ai nervi adiacenti. Inoltre, il CGF in aggiunta alle cellule staminali CD34<sup>+</sup> ha riportato vantaggi significativi in termini di accelerazione nella guarigione delle ferite, di riparazione dei tessuti molli e nella formazione di nuovo osso.

*Controindicazioni del CGF*

Il trattamento con CGF autologo è in genere considerato sicuro in pazienti adeguatamente valutati. I potenziali candidati per il trattamento con CGF dovrebbero essere sottoposti a un pretrattamento di valutazione ematologica al fine di escludere potenziali coagulopatie e disturbi della funzione piastrinica. I pazienti con anemia e quelli con trombocitopenia possono essere candidati non idonei per il trattamento con CGF. Altre potenziali controindicazioni includono: instabilità emodinamica; grave ipovolemia; angina instabile; sepsi; anticoagulanti o terapia farmacologica fibrinolitica.

**Materiali e Metodi***Materiali**Generatore di ozono*

L'ozono è stato prodotto tramite generatore medicale di ozono (Normativa CE o equivalente direttiva extra-europee) capace di generare concentrazioni tra 1 e 100 µg/mL (mg/L) secondo le direttive farmaceutiche). L'apparecchiatura utilizzata è provvista di sistema optoelettronico con microprocessore connesso alla sorgente di generazione del gas per leggere e tenere costante la generazione di ozono. (Ozonette, Sedecal, Spagna).

*Separatore cellulare*

Per la preparazione del CGF fu utilizzata il separatore Medifuge MF200 (Silfradent srl, Santa Sofia, Italia) a velocità non costanti: 30 s di accelerazione, 2 min a 2700<sup>-1</sup>, 4 min a 2400 r·m<sup>-1</sup>, 4 min a 2700<sup>-1</sup>, 3 min a 3000<sup>-1</sup> e 36 s per la decelerazione e fermati. Sono risultate tre frazioni di sangue: (1) la superiore, che corrispondeva al plasma povero di piastrine (PPP); (2) la centrale che corrispondeva al plasma ricco di piastrine (PRP); (3) lo strato inferiore di globuli rossi (RBC).

*Attivatore dell'albumina*

Per la preparazione del gel piastrinico fu utilizzata il APAG (Silfradent srl, Santa Sofia, Italia) a 75 °C per 10 min.

*Metodi*

Lo studio clinico (caso clinico) si configura come uno studio pilota di fattibilità monocentrico, di fase 2, secondo una metodologia codificata internazionale e in accordo con la normativa regolatoria nazionale e sovranazionale. Per tale motivo fu arruolata una paziente con lesioni post rimozione di un granuloma per acido ialuronico previamente trattato con ialuronidasi e LASER. Il paziente ha dato il loro consenso a partecipare in modo libero e consapevole.

*Preparazione del filler di plasma ricco di piastrine ozonizzate (PRPO3)*

Per attivare produrre il PRP attivare la frazione PRP con ozono e preparare il filler, abbiamo eseguito il protocollo seguenti:

1. Prelievo di sangue venoso usando un ago calibro 21 G. Il sangue 36 mL fu raccolto in provette sterili da 9 mL precaricate con eparina sodica (15-30 UI).
2. Le provette furono centrifugate nel concentratore di fattori di crescita (Medifuge MF200, Silfradent srl®, Santa Sofia, Italia) utilizzando il programma denominato "CGF" (tempo prefissato: 14 min).
3. Estrazione di cellule CD34<sup>+</sup>: CD34<sup>+</sup> si trovano tra il buffy coat e la frazione PRP. La frazione CD34<sup>+</sup> furono prelevare con un ago lungo 18 G × 75 mm (senza rimuovere il cappuccio dalle provette). Si prelevarono circa 0,2 mL per ogni provetta. Questo tipo di cellula non fu sottoposto a attivazione né ozonizzazione.
4. Separazione della frazione PRP e PPP. Di ogni provetta fu aspirato con un ago 18 G × 75 mm 2,5 mL di PRP e circa 3 mL di PPP.
5. Attivazione del PRP: Il PRP fu attivato con un volume identico di ozono a 40 µg / mL per 30 s.

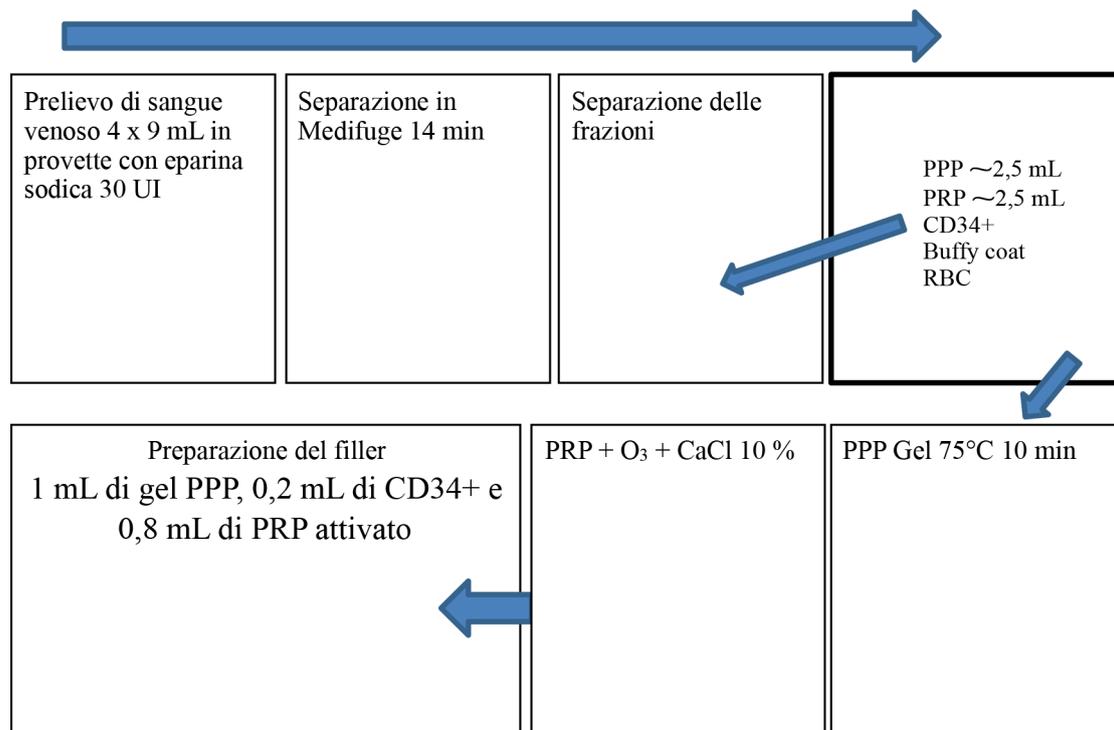


Figura 1 Schema della procedura per la preparazione del filler.

Eg. 4 mL di PRP + 4 mL di O<sub>3</sub> a 40 µg / mL. L'ozono e il PRP furono miscelati dentro una siringa siliconata. Alla fine di questo processo l'ozono reagisce con l'albumina e le piastrine e viene trasformato in O<sub>2</sub>. Il gas rimanente fu eliminato.

6. Attivazione del PRP con cloruro di calcio al 10 %. Per ogni 1 mL di PRP attivato con ozono fu aggiunto 0,05 mL (50 µL) di cloruro di calcio al 10 %. Cioè, per ogni 4 mL di PRP, 0,2 mL di cloruro di calcio.
7. L'attivazione (fase 5 e 6) fu eseguita 10 min prima dell'applicazione.
8. Preparazione del gel piastrinico: Il PPP fu introdotto nel APAG in siringe da 2 mL e attivato il programma "Denaturalizzazione di albumine" a 75 C per 10 min. Le siringe furono rimosse e lasciate riposare al buio per 10 min.
9. Preparazione del filler: tramite un connettore Luer maschio maschio e 2 siringe Luer Lock furono miscelati il gel PRP, PRP e la frazione CD34<sup>+</sup> nella seguente proporzione: 1 mL di gel PPP, 0,2 mL di CD34<sup>+</sup> e 0,8 mL di PRP attivato con ozono e cloruro di calcio (Figura 1).

#### Applicazione del Filler

La zona da trattare fu pulita con disinfettante cutaneo. Il paziente fu trattato con crema anestetica locale EMLA con occlusione per 45 min. L' EMLA

fu rimosso e il filler fu applicato tramite una cannula 25 G × 20 mm per via intradermica su tutta la zona lesionata.

*Criteri di inclusione.* Paziente con lesione traumatica originata dalla rimozione di un granuloma per iniezione di acido ialuronico trattato con ialuronidasi e LASER.

*Criteri di esclusione.* Furono controllati i seguenti criteri di esclusione: Rifiuto del consenso allo studio. Ipsensibilità alla miscela di ossigeno-ozono. Presenza di controindicazioni assolute secondo linee guida FIO (linea guida: T022). Presenza di controindicazioni relative secondo le linee guida FIO: (linea guida: T022) Pervietà del Forame Ovale, Minore età, Terapie antiaggreganti sistemiche.

Durata e modalità di somministrazione del trattamento. Il protocollo di studio è stato effettuato dal 1.07.2014 al 31.01.2015 nella struttura privata Golden Salus a San Marino. Durante tale periodo di studio sono state effettuate 5 sedute di PRP filler sistemica per via intradermica una ogni 21 giorno.

#### Schema di trattamento

La paziente femmina di età anagrafica 54 anni, presentava il profilo ematologico e biochimico dentro la norma. L' esame clinico, mostrava una lesione bilaterale sulla zona zigomatica, risultato della rimozione di un granuloma per infiltrazione con acido ialuronico. Il granuloma fu rimosso con

LASER tramite la introduzione di una cannula all'interno, e successivamente trattato con ialuronidasi.

#### *Supporto assistenziale (risorse umane e strumentali)*

L'attività è stata svolta esclusivamente da Medici Chirurghi specificatamente addestrati all'utilizzo della terapia con CGF (PRP) e miscela di ossigeno-ozono, col possibile sussidio del personale infermieristico e ausiliario.

#### *Rischi associati alla sperimentazione*

Non sono state segnalate in letteratura complicanze di ogni genere, purché la somministrazione sia effettuata con metodica corretta, concentrazioni precise e dosi adeguate, compatibili all'età e alle condizioni cliniche del paziente.

#### *Variabili raccolte e tempi*

##### *Tempi di raccolta delle variabili*

T0 all'arruolamento e prima della terapia con Filler PPP

T1 dopo 21 giorni dal termine della prima seduta

T2 dopo 42 giorni dalla I seduta e prima della II seduta con filler PPP

T3 dopo 63 giorni dalla II seduta e prima della III seduta con filler PPP

T4 dopo 84 giorni dalla III seduta e prima della IV seduta con filler PPP

T5 dopo 105 giorni dalla IV seduta e prima della V seduta con filler PPP

Follow-up 1 mese, 6 mese, 1 anno, 2 anni, 3 anni e 4 anni dopo T5.

#### *Variabili raccolte*

##### *Variabile principale*

Volume della lesione: area e perimetro della lesione e rappresentazione 3D per il calcolo del volume in mm<sup>3</sup> fu valutato tramite la digitalizzazione della foto della lesione e il calcolo col software Adobe Photoshop CS<sup>®</sup>, ImageJ).

##### *Psicologiche (T0, T4)*

– questionario di qualità di vita validato per la misura del distress: PGWBI: Psychological General Well Being Intex).

##### *Variabili secondarie*

Foto evolutiva della lesione (T0, T1, T2, T3, T4, T5).

##### *Analisi statistica*

Sono state fornite statistiche descrittive di tutte le variabili raccolte ai diversi tempi previsti dallo

studio. È stata confrontata l'evoluzione delle variabili nel paziente in seguito al trattamento. Le significatività statistiche eventualmente riscontrate non hanno un valore conclusivo, ma di generazione d'ipotesi, a causa dell'esiguo numero dei pazienti studiati (un solo caso).

## **Risultati**

### *Risultato della misurazione de volume della lesione*

Nella tabella 1 si rappresenta il volume della lesione e la sua evoluzione nel tempo. Come evidenziano i dati il volume fu gradualmente decrescendo fino alla scomparsa della lesione, in entrambi zigomi. Dalla prima seduta (21 giorni dopo) si può apprezzare una diminuzione significativa del volume con rispetto al tempo iniziale.

**Tabella 1** Follow-up del volume delle lesioni negli zigomi trattati col filler PRPO3

Tempi di raccolta delle variabili	Volume della lesione (mm <sup>3</sup> )			
	Zigomo destro		Zigomo sinistro	
	Media	D.E.	Media	D.E.
T0	903,6	± 246,2	835,9	± 251,1
T1	710,1	± 211,4	739,3	± 199,3
T2	578,6*	± 173,7	436,8*	± 176,5
T3	57,0*	± 71,3	68,1*	± 81,7
T4	37,1*	± 56,4	49,6*	± 61,1
T5	9,9*	± 44,1	8,7*	± 56,9

*Legenda:* Tempi di raccolta delle variabili; T0, all'arruolamento e prima della terapia con Filler PPP; T1, dopo 21 giorni dal termine della prima seduta; T2, dopo 42 giorni dalla I seduta e prima della II seduta con filler PPP; T3, dopo 63 giorni dalla II seduta e prima della III seduta con filler PPP; T4, dopo 84 giorni dalla III seduta e prima della IV seduta con filler PPP; T5, dopo 105 giorni dalla IV seduta e prima della V seduta con filler PPP. \* Differenze significative p<0,05 con rispetto a T0.

Il cambio più importante si osserva dopo la terza seduta T3. Non sono stati riportati effetti collaterali significativi, altro che dolore locale lieve durante la applicazione e piccoli lividi nella zona.

### *Valutazione dell'indici di sovraccarico da stress in seguito a terapia con filler PRPO3*

In seguito a trattamento con PRPO3 locale si osservato una modifica dei punteggi che indagano il sovraccarico da stress misurato con PGWBI (Figura 2). Si noti che, più alto è il punteggio, migliore è il livello di benessere psicologico-emotivo percepito; valori inferiori a 72 indicano distress moderato; valori inferiori a 60 indicano sovraccarico da stress severo. In particolare si è osservato un aumento significativo (p<0,05) di tutte le variabili che indicano l'andamento psicologico della paziente, tranne il auto controllo che non era critico all'inizio dello studio.

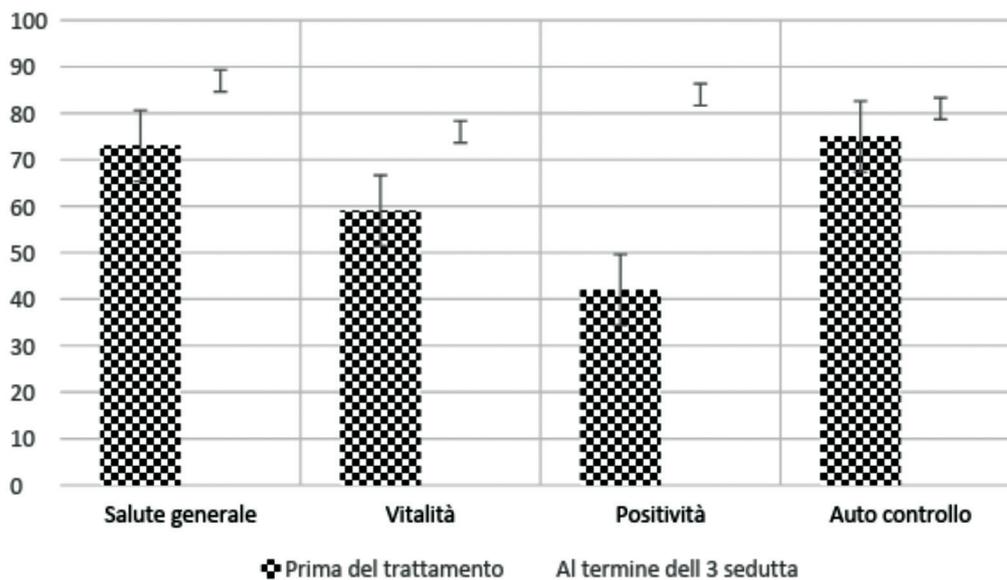


Figura 2 Andamento degli score di sovraccarico da stress (PGWBI) in seguito alle sedute con PRPO3. \* Differenze significative ( $p < 0,05$ ) con rispetto allo stadio iniziale.

#### Foto evolutiva delle lesioni.

La evoluzione della paziente (Figura 3A-C) evidenzia una evoluzione positiva della lesione fino alla scomparsa totale.

#### Discussione e Conclusioni

Tecnologia PRP apre nuove prospettive nel campo della rigenerazione dei tessuti umani ed è uno strumento prezioso per il trattamento di una vasta gamma di lesioni dei tessuti, ortopedia, medicina dello sport, medicina estetica, vascolare, odontoiatria, implantologia, chirurgia maxillo-facciale, oftalmologia e altri. La attivazione del PPR con ozono si è dimostrata molto efficace dal punto di vista clinico, così come la loro combinazione con la applicazione dell'ozono convenzionali. In questo campo si sono accumulati dati clinici basati sulle osservazioni empirica, ma la creazione di protocolli standard e approfondire nello studio clinico e molecolari dei meccanismi di azione di questa preparazione è necessario.

Il concentrato di fattori di crescita (*Concentrated Growth Factors* - CGF) è un prodotto autologo che raccoglie in un piccolo volume di plasma un gran numero di fattori di crescita oltre alle cellule staminali CD34<sup>+</sup>. La preparazione del CGF viene fatta grazie alla tecnologia della centrifugazione in gradiente, di cui sarebbe pioniere una ditta Italiana (Silfradent, Santa Sofia, Italia). Il sangue è una fonte ottimale nella maggior parte delle tecniche di ingegneria tissutale per la guarigione di grandi

lesioni. Il CGF (la seconda generazione di PRP) lavora come un adesivo tissutale di fibrina in grado di dare una tenuta emostatica e tissutale. Il CGF è un biomateriale emostatico immediato, biocompatibile, sicuro ed efficace. Il CGF accelera la rigenerazione endoteliale, epiteliale ed epidermica, stimola l'angiogenesi, accresce la sintesi del collagene, favorisce la guarigione dei tessuti molli e duri, riduce le cicatrici cutanee, migliora la risposta emostatica a una lesione,. L'alta concentrazione di leucociti presente nel CGF aggiunge inoltre un effetto antimicrobico. Inoltre la lipossina A4 rilasciata dalle piastrine conferisce un effetto antinfiammatorio<sup>29</sup>.

Il CGF esercita i suoi effetti benefici attraverso la degranolazione dei granuli alfa delle piastrine, che contengono fattori di crescita ritenuti importanti nella fase iniziale di guarigione di una ferita. Quando le piastrine bifasiche presenti nel CGF attivato dalla trombina si aggregano, rilasciano fattori di crescita, insieme ad altre sostanze che servono ad accelerare il processo di guarigione, aumentando così la proliferazione cellulare, la formazione della matrice, la produzione osteoide, la guarigione del tessuto connettivo, l'angiogenesi e la sintesi del collagene. Il primo passo, ossia la secrezione attiva di questi fattori di crescita, avviene entro pochi minuti dall'inizio della sequenza di coagulazione, e più del 90 % dei fattori di crescita sono secreti durante la prima ora nei primi 3 giorni. Dopo questo scatto iniziale, in una seconda fase, le diverse piastrine secernono fattori di crescita addizionali per i rimanenti 7 giorni della loro vitalità. Sopraggiungono poi i macrofagi, a causa della crescita vascolare stimolata dalle piastrine, che regolano la guarigione della ferita secernendo alcuni



Figura 3 Foto rappresentative della evoluzione della paziente. A. granulomi per acido ialuronico. B. Situazione dopo la rimozione con LASER e ialuronidasi. C stadio finale 21 giorni dopo la 5 seduta di PRPO3.

di quegli stessi fattori di crescita addizionali.

Nel CGF sono inoltre presenti: cellule TGF- $\beta$ 1, VEGF e CD34<sup>+</sup> <sup>31</sup>. L'impiego di CFG porta a un'eccellente guarigione nel caso di lesione ossee di dimensioni critiche *in vivo* <sup>30</sup>, nel caso di perdita di capelli <sup>32</sup>, nella compromissione delle zone periferiche e in caso di ischemia miocardica <sup>33</sup>.

Studi condotti sull'uomo hanno dimostrato che CFG può essere vantaggioso e di facile applicazione in chirurgia e in terapia. Il CGF è stato utilizzato in pazienti sottoposti a interventi di chirurgia estetica, tra cui lifting, aumento del seno, riduzioni del seno e

nella chirurgia dell'ascensore del collo. L'utilizzo di CGF, nel caso di plasma povero di piastrine (PPP), è stato applicato anche per creare una matrice in grado di arrestare il sanguinamento, poiché il PPP contiene più elevate quantità di fibrinogeno, albumina, globuli bianchi, citochine solubili. È stato riportato che il sanguinamento dei capillari si è effettivamente chiuso entro i tre minuti successivi l'applicazione di PRP e PPP. Si è inoltre notato un ulteriore vantaggio nella possibile riduzione dell'uso di elettrocauterizzazione, limitando così il rischio di danni ai nervi adiacenti. Inoltre, il CGF

in aggiunta alle cellule staminali CD34<sup>+</sup> ha riportato vantaggi significativi in termini di accelerazione nella guarigione delle ferite, di riparazione dei tessuti molli e nella formazione di nuovo osso.

Nel caso che si presenta, si evidenzia che dalla prima seduta (21 giorni dopo) si inizia una riduzione del danno tissutale, manifesto per la riduzione del volume delle lesioni. Dopo tre sedute si ha un notevole miglioramento e finalmente dopo 5 sedute la paziente recupera totalmente il volume normale di entrambe le zone zigomatiche. La evoluzione

delle lesioni si accompagna ad un miglioramento significativo ( $p < 0,05$ ) della condizione psicologica della paziente. Quindi l' applicazione del PRPO3 comporta un passo in avanti nella rigenerazione tissutale, ed è priva di effetti collaterali.

Questo caso clinico suggerisce che il CGF attivato con ozono e miscelato con il gel di PPP può agire come stimolante nella rigenerazione dei fibroblasti. Questi risultati forniscono nuove conoscenze sull'uso di questa terapia in medicina estetica.

## Bibliografia

- 1 Schwartz-Tapia A, Martínez-Sánchez G, Sabah F, et al. Madrid Declaration on Ozone Therapy. ISCO3 2015: 50.
- 2 Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 2011; 1: 29.
- 3 Re L, Martínez-Sánchez G, Bordinchia M, et al. Is ozone preconditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway *in vivo*? A preliminary result. *Eur J Pharmacol.* 2014; 742: 158-162.
- 4 Ahmed LA, Salem HA, Mawsouf MN, et al. Cardioprotective effects of ozone oxidative preconditioning in an *in vivo* model of ischemia/reperfusion injury in rats. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012; 72 (5): 345-354.
- 5 Babior BM, Takeuchi C, Ruedi J, et al. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100 (6): 3031-3034.
- 6 Forman HJ. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radic Biol Med.* 2016; 97: 398-407.
- 7 Narasimhan M, Rajasekaran NS. Exercise, Nrf2 and Antioxidant Signaling in Cardiac Aging. *Front Physiol.* 2016; 7: 241.
- 8 Bocci V, Valacchi G, Rossi R et al. Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. *Platelets.* 1999; 10 (2-3): 110-116.
- 9 Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm.* 1999; 8 (4-5): 205-209.
- 10 Re L, Martínez-Sánchez G, Perez-Davison G, et al. Role of Ozone/Oxygen in Fibroblast Growth. Factor Activation. *Discovering the Facts. International Journal of Ozone Therapy.* 2010; 9: 55-58.
- 11 Parulan MAA, Sundar G, Lum JH, et al. A case report on dermal filler-related periorbital granuloma formation. *Orbit.* 2018: 1-4.
- 12 Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, et al. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 267 (1): 30-40.
- 13 Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, et al. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Eur J Pharmacol.* 2017; in press.
- 14 ISCO3: Guidelines and Recommendations for Medical Professionals Planning to Acquire a Medical Ozone Generator. <http://www.isco3.org/offdocs.html>. In., 1 edn. Madrid; 2014.
- 15 Pharmacopoeia J (ed.). Japanese Pharmacopoeia <http://jpd.nihs.go.jp/jp15e/>. 2006.
- 16 EIGA: European industrial gases association AISBL. Comparison of European, US & Japanese pharmacopoeia monographs for medicinal gases. MGC Doc 152/11/E Revision of Doc 152/08. Avenue des Arts 3-5 B 1210 Brussels. [www.eiga.eu](http://www.eiga.eu) [Revised 07/06/2013]. In.; 2011.
- 17 Wallner F. International Ozone Association (IO<sub>3</sub>A) Ozone News. [www.io3a.com](http://www.io3a.com). 2005; 33: 14-15.
- 18 Viebahn-Hänsler R, Fernández OSL, Fahmy Z. Ozone in Medicine: The Low- Dose Ozone Concept. Guidelines and Treatment Strategies. *Ozone Science & Engineering.* 2012; 34 (6): 408-424.
- 19 Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 216 (3): 493-504.
- 20 Bocci V. Ozone: A new medical drug. ISBN-10: 9048168058. ISBN-13: 978-9048168057. Velio Bocci editions. Netherlands, Springer. 2010.
- 21 Bocci V. Oxygen-Ozone therapy. A critical evaluation: The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 2002.
- 22 Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, et al. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis.* 2009; 42 (3): 267-278.
- 23 NIH: National Institutes of Health. National Cancer Institute. U.S. Dep. of health and human services.Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 4.0. (v. 4.03: June 14, 2010) [http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf). 2010.
- 24 de Boer HC, van Oeveren-Rietdijk AM, Rotmans JI, et al. Activated platelets correlate with mobilization of naive CD34(+) cells and generation of CD34(+)/KDR(+) cells in the circulation. A meta-regression analysis. *J Thromb Haemost.* 2013; 11 (8): 1583-1592.
- 25 Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2008; 1 (3-4):165-174.
- 26 Lee KS, Wilson JJ, Rabago DP, et al. Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future? *AJR Am J Roentgenol.* 2011; 196 (3): 628-636.
- 27 Pacifici L, Casella F, Maggiore C. [Platelet rich plasma (PRP): potentialities and techniques of extraction]. *Minerva Stomatol.* 2002; 51 (7-8): 341-350.
- 28 Cieslik-Bielecka A, Bielecki T, Gazdzik TS, et al. Autologous platelets and leukocytes can improve healing of infected high-energy soft tissue injury. *Transfus Apher Sci.* 2009.
- 29 Osterman C, McCarthy MB, Cote MP, et al. Platelet-Rich Plasma Increases Anti-inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. *Am J Sports Med.* 2015; 43 (6): 1474-1484.
- 30 Honda H, Tamai N, Naka N, et al. Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in Rattus norvegicus calvaria defect model. *J Artif Organs.* 2012; 16 (3): 305-315.
- 31 Rodella LF, Favero G, Boninsegna R, et al. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc Res Tech.* 2011; 74 (8): 772-777.
- 32 Kang JS, Zheng Z, Choi MJ, et al: The effect of CD34<sup>+</sup> cell-containing autologous platelet-rich plasma injection on pattern hair loss: a preliminary study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2014; 28 (1): 72-79.
- 33 Mackie AR, Losordo DW. CD34-positive stem cells: in the treatment of heart and vascular disease in human beings. *Tex Heart Inst J.* 2011; 38 (5): 474-485.

Dr.ssa Paola Pederzoli  
 Clinica Nuova Ricerca  
 Via Luigi Settembrini, 17  
 47924 Rimini, Italy  
 Tel.: +39 0541 319407  
 Mobile: +39 329 7381132  
 E-mail: pederzoli.paola@gmail.com

**CILAO** | 20-23 NOVIEMBRE | LOS DESAFIOS DE LA OZONOTERAPIA EN EL TERCER MILENIO

VII Congreso Ibero Latinoamericano de Ozonoterapia 2019

- Modulador del estrés oxidativo y antioxidante
- Tratamiento de dolor benigno en patologías muscoesqueléticas y columna
- Inmunoregulador en enfermedades inmunológicas
- Inmunoterapia y Cáncer
- Terapia para el tratamiento de enfermedades infecciosas

HOTEL CUMBRES - PUERTO VARAS, CHILE

Para mayor información ingresa a nuestro sitio web

[www.cilao2019.cl](http://www.cilao2019.cl)

Logos: APPTO CHILE, OZONOTERAPIA CHILE, WFOT, inter expo

# Effects of Systemic Ozone Therapy on Plethysmographic and Impedance Parameters

CHIARA CUSA<sup>1\*</sup>, GREGORIO MARTÍNEZ-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, ELENA MAINARDI<sup>3</sup>, CLAUDIA CASARINI<sup>4</sup>, DANILLO MIOTTI<sup>5</sup>

<sup>1\*</sup> ASST Pavia, Dipartimento di Area Medica U.O. Medicina Interna. Ospedale Civile di Casorate Primo; Casorate Primo, Pavia, Italy

<sup>2</sup> Medical Center Beauty Benefit, San Biagio di Osimo; Osimo, Ancona, Italy

<sup>3</sup> Studio Medico; Pavia, Italy

<sup>4</sup> Ambulatorio di Terapia del Dolore, U.O. Cure Palliative. Istituti Scientifici Maugeri; Pavia, Italy

<sup>5</sup> Direttore U.O. Cure Palliative, Terapia del dolore, Istituti Clinici Scientifici Maugeri; Pavia, Italy

**Key words:** Ozone, oxidative stress, chronic stress, preconditioning, hearth rate variability, psychological wellbeing, bioimpedance measure, allostatic load

**ABSTRACT - Background:** Systemic Ozone Therapy reduces oxidative stress markers and is beneficial in the treatment of chronic stress conditions. The aim of the study is to delineate potential non-invasive measures of ozone therapy efficacy in patients with chronic stress conditions.

**Methods:** Healthy volunteers were administered systemic oxygen-ozone treatments for 2 weeks. Psychometric, bio-impedance and heart variability measurements were detected six times during the protocol. The amount of blood used was standardized in order to ensure the same ozone concentration for each subject.

**Results:** Increase in PGWBI (Psychological General Well Being Index) values were observe in terms of “vitality” (T0=65±5 vs. T5=75±5) and “positive well-being” (T0=55±5 vs. T5=62.5±7.5). Extracellular water content decreased immediately after therapy (T2=14.65±1.1 vs. T3=14.30±1.7; T4=14.65±1.45 vs. T5=14.35±1.1), but increased at the end of the study (T0=13.75±0.85 vs. T4=14.65±1.45). Extracellular matrix content decreased during the schedule before treatments (T0=16.6±0.15 vs. T2=16.2±0.05 vs. T4=16.2±0.25), but increased immediately after the II and IV session (T2=16.2±0.05 vs. T3=16.45±0.3; T4=16.2±0.25 vs. T1=16.35±0.25). Mean heart rate decreased immediately after each session (T0=73.0±7.8 vs. T1=69.4±6.55; T2=79.15±3.1 vs. T3=72.2±1.3; T4=81.4±4.85 vs. T5=78.4±2.3). Root Mean Square of the Successive Differences (RMSSD) increased after each treatment (T0=24.5±6.5 vs. T1=38.0±10.5; T2=27.5±9.5 vs. T3=27.5±5.5; T4=19.0±4.5 vs. T5=20.0±4.5).

**Conclusion:** The data obtained showed an improvement of the psychometric indices measuring chronic stress perception after four session of systemic ozone therapy. Modification of bio-impedance measures and heart rate variability indices were also documented suggesting that non-invasive measures may be suitable to monitor ozone therapy effects in chronic stress condition.

## Introduction

International studies showed the clinical efficacy of ozone therapy in a vast number of pathologies, and pointed out to some possible mechanisms behind its activity. Ozone is a strong pro-oxidant molecule that induces a controlled production of highly reactive free radicals able to promote, directly or via their metabolites, oxidative preconditioning which leads to redox system rebalance, better tissues oxygen release, removal of toxic catabolites and improve in microcirculation with formation of new small blood vessel<sup>1-7</sup>.

Ozone administration modalities are described in the guidelines defined by national (Federazione

Italiana Ozonoterapia – FIO) and international societies (International Scientific Committee of Ozone Therapy – ISCO3)<sup>8</sup>.

In pathological conditions, aging<sup>9,10</sup>, and under high allostatic load<sup>11-13</sup>, a chronic excess of free radicals (especially superoxide radicals) is produced, inducing damage to phospholipid membrane, impaired membrane metabolic processes, diminished mitochondrial function and insufficient detoxification of reactive oxygen compounds; consequently, the development and progression of degenerative pathologies are facilitated. Therefore, a therapy based on an oxygen-ozone mixture has the potential to be useful for aging-associated diseases and for every condition caused by high allostatic load.

Recent data correlated allostatic load with behavioural modifications (measurable via psychometric tests)<sup>11-13</sup>, biochemical changes (inflammatory and cellular immunity indices, oxidative stress, cytokine pattern)<sup>14</sup>, and specific biological (pressure values and heart rate variability)<sup>15-17</sup>, and functional (e.g. bioimpedance, plethysmography) feature<sup>14-16</sup>. In particular, scientific literature data demonstrated that subjects under high allostatic load show specific by bioimpedance and plethysmographic features such as increase in extracellular water (ECW) content and extracellular matrix (ECM), accompanied by heart rate variability (HR) reduction. The measuring of functional parameters (e.g. bioimpedance, plethysmography) is of particular interest since it allows to monitor the effects of treatments through a non-invasive, quick, and repeatable way, without using more invasive and expensive diagnostic instruments (e.g. blood chemistry tests and instrumental exams).

## Objective

This research was carried out as a feasibility study for the clinical evaluation of parenteral systemic oxygen-ozone therapy in healthy subjects under allostatic load. Objective of this study was assessing if the treatment induce modifications of functional (psychometric and biological) parameters in apparently «healthy» subjects which are under allostatic load. The primary outcome of the study is to measure the allostatic load via a psychometric scale (Psychological General Well Being Index – PGWBI)<sup>18,19</sup>. The secondary outcomes are to measure functional-biological data obtained via non-invasive measuring (bioimpedance and plethysmography).

## Results

4 subjects were enrolled (Table 1). No significant side effects were reported. Due to the very small number of subjects, outcomes are shown as median ( $\pm$  median absolute deviation). Data are shown in the following figures.

### Modification of allostatic load indices

The PGWBI<sup>18,19</sup> consists of 22 self-administered items, rated on a 6-point scale so the score varies between 22 to 132, which assess psychological and general well-being of respondents in six health related quality of life (HRQoL) domains: anxiety, depression, positive well-being, self-control, general

health and vitality. The higher scores indicate better perceived psychological and emotional wellbeing; a score under 72 represents moderate distress; a score under 60 represents severe distress. After systemic oxygen-ozone therapy, a change in the allostatic load measurement via PGWBI was observed (Figure 1). In particular, improvements in “vitality” (T0=60 $\pm$ 5; T5=75 $\pm$ 5) and “positive well-being” (T0=55 $\pm$ 5; T5=62.5 $\pm$ 7.5) were observed.

**Table 1** Enrolled subjects’ characteristics. Baseline measurements (expressed as range for females).

	Baseline (T0: before treatment)	
	3 females	1 male
Sex	3 females	1 male
Age (years)	48-62	55
Body weight (kg)	59-63.3	93
Height (cm)	163-165	183
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.5-23.8	27.8 (overweight)
ECW (L)	12.8-14.5	20.3
ECM (kg)	16.5-16.8	15.8
Mean HR	70.9-90.6	59.5
RMSSD	19-30	32
Score PGWBI “general health”	66-93	86
Score PGWBI “vitality”	55-85	55
Score PGWBI “positive well-being”	50-65	50
Score PGWBI “self-control”	66-86	73

### ECW

An increase in ECW was observed after the first 3 sessions of systemic oxygen-ozone therapy (T0=13.75 $\pm$ 0.85; T2=14.65 $\pm$ 1.1; T4=14.65 $\pm$ 1.45) (Figure 2). 30 mins after every session of oxygen-ozone therapy, the amount of ECW raised (T0 vs. T1; T2 vs. T3; T4 vs. T5). 30 mins after the II (T3) and IV (T5) session, the amount of ECW was observed to decrease compared to the measurements taken before the therapy administration (T2=14.65 $\pm$ 1.1 vs. T3=14.3 $\pm$ 1.7; T4=14.65 $\pm$ 1.45 vs. T5=14.35 $\pm$ 1.1).

### ECM

ECM was modified after the oxygen-ozone therapy (Figure 3). In particular, ECM% decreased 30 mins (T0=16.6 $\pm$ 0.15 vs. T1=16.45 $\pm$ 0.15) and 72 hours after the I session of systemic oxygen-ozone therapy and it remained lower than the baseline even before the IV session (T0=16.6 $\pm$ 0.15; T2=16.2 $\pm$ 0.05; T4=16.2 $\pm$ 0.25). ECM% decreased 30 mins after the I session (T0 vs. T1), whereas it increased 30 mins after the II and IV session (T2 vs. T3; T4 vs. T5).

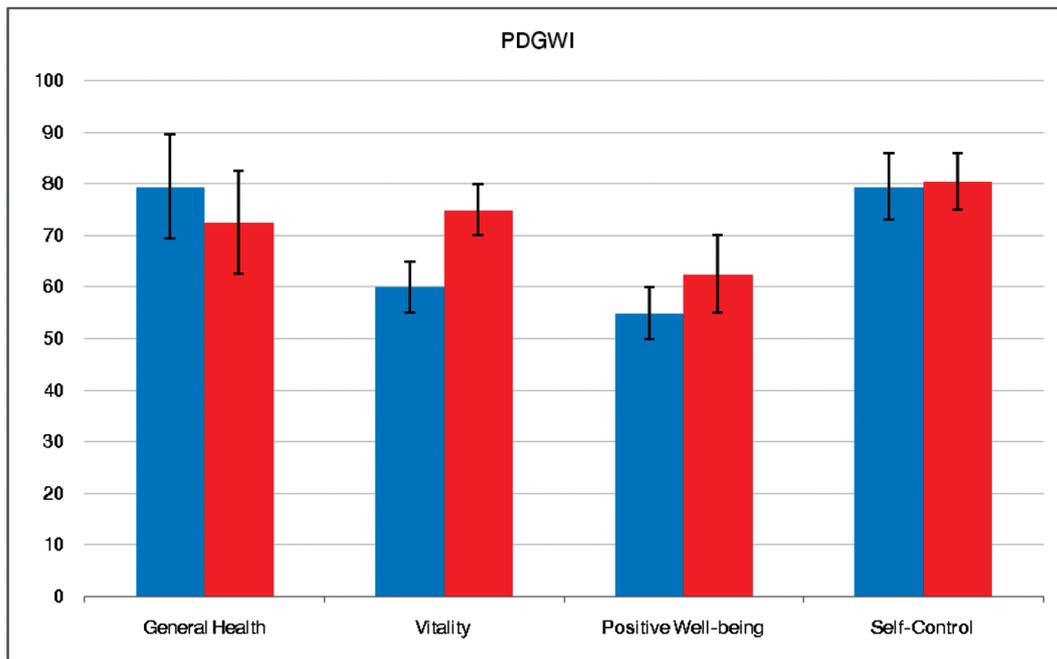


Figure 1 Allostatic load score measured via PGWBI, at the beginning of the study (blue bars) and after (red bars) 4 sessions of parenteral oxygen-ozone therapy. The figure synthesises the quantitative modifications of some indices of perceived allostatic load after parenteral oxygen-ozone therapy. The treatment induced an increase in perceived “vitality” and “positive well-being”. The higher the score, the higher the perceived psychological and emotional wellbeing; scores below 72 mean moderate distress; scores below 60 mean severe allostatic load.

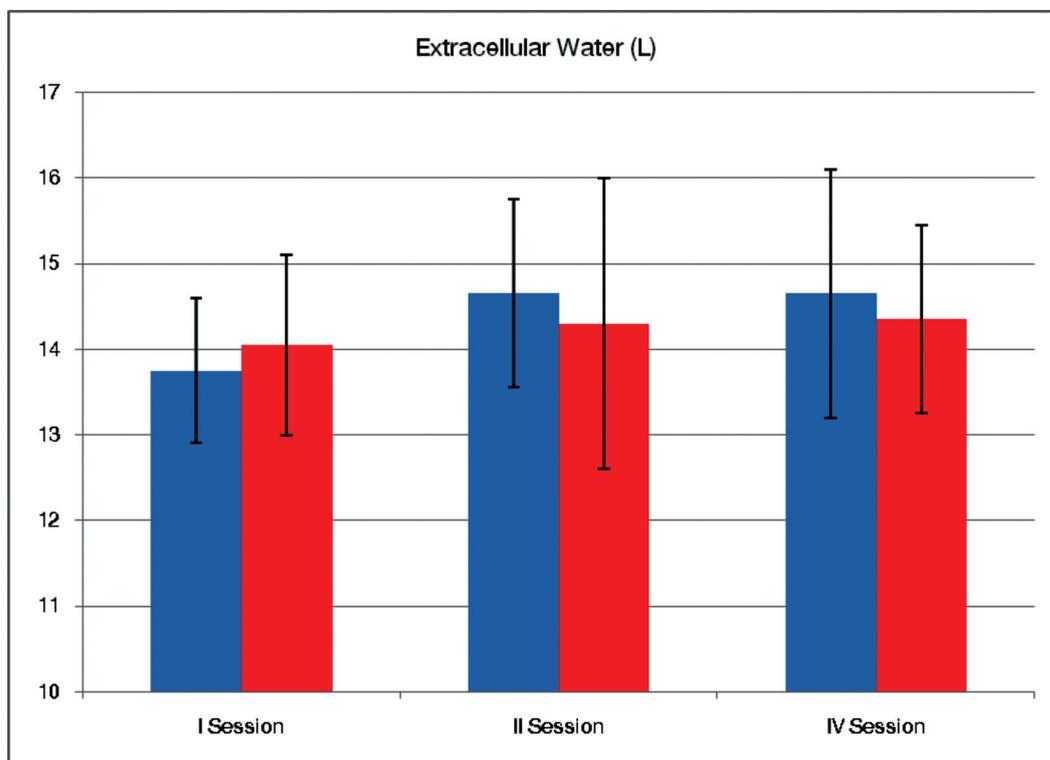


Figure 2 ECW behavior before (blue bars) and 30 minutes after (red bars) parenteral oxygen-ozone therapy. The figure shows variation in ECW after administration of oxygen-ozone blends. After the I session, ECW (expressed in litres) increased compared to the basal level. 30 mins after the II and IV session, ECW decreased compared to the basal level. Moreover, during the first 3 therapeutic sessions an increase in basal ECW (blue bar) was observed, just as 30 mins after each oxygen-ozone session.

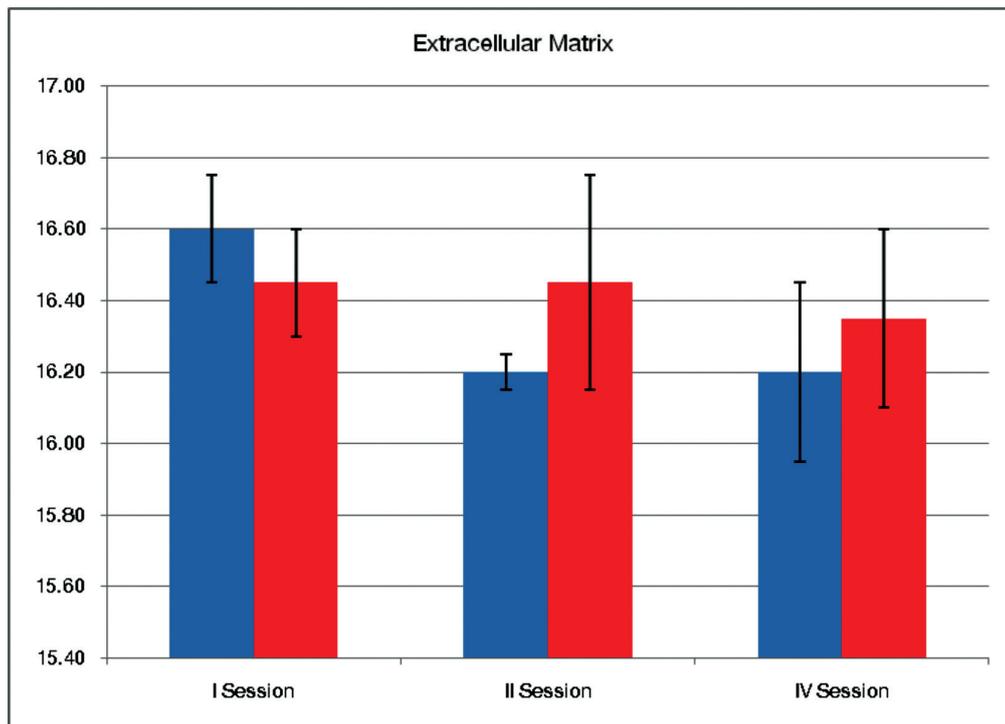


Figure 3 ECM variation before (blue bars) and 30 minutes after (red bars) system oxygen-ozone therapy. The figure shows variation in ECM after administration of systemic therapy of oxygen-ozone blends. 30 mins after the I therapeutic session, ECM decreased. After the II and IV session, oxygen-ozone therapy induced an increase in ECM%. In addition, after every session basal ECM reached a lower level (blue bars).

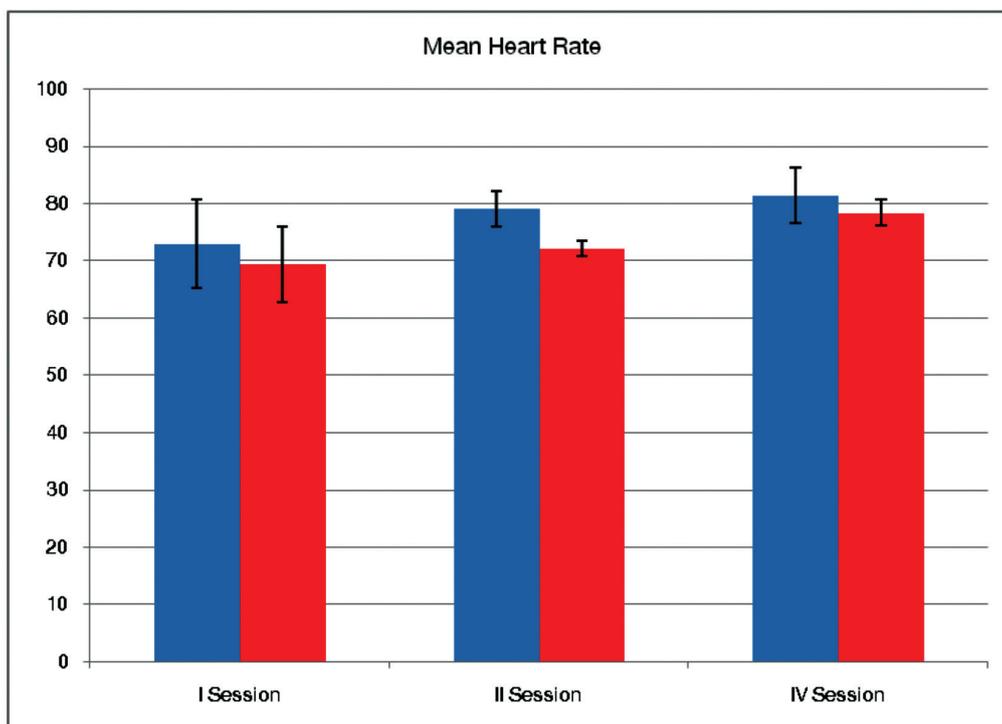


Figure 4 Mean heart rate modification before (blue bars) and 30 minutes after (red bars) systemic ozone-therapy. The figure shows variation in mean heart rate (HR) after ozone therapy. Mean HR progressively increased among the therapeutic sessions, both in basal level (blue bars) and 30 mins after treatment (red bars). 30 mins after every session, however, mean HR is observed to decrease, suggesting the possible activation of the cholinergic vagal system due to ozone therapy.

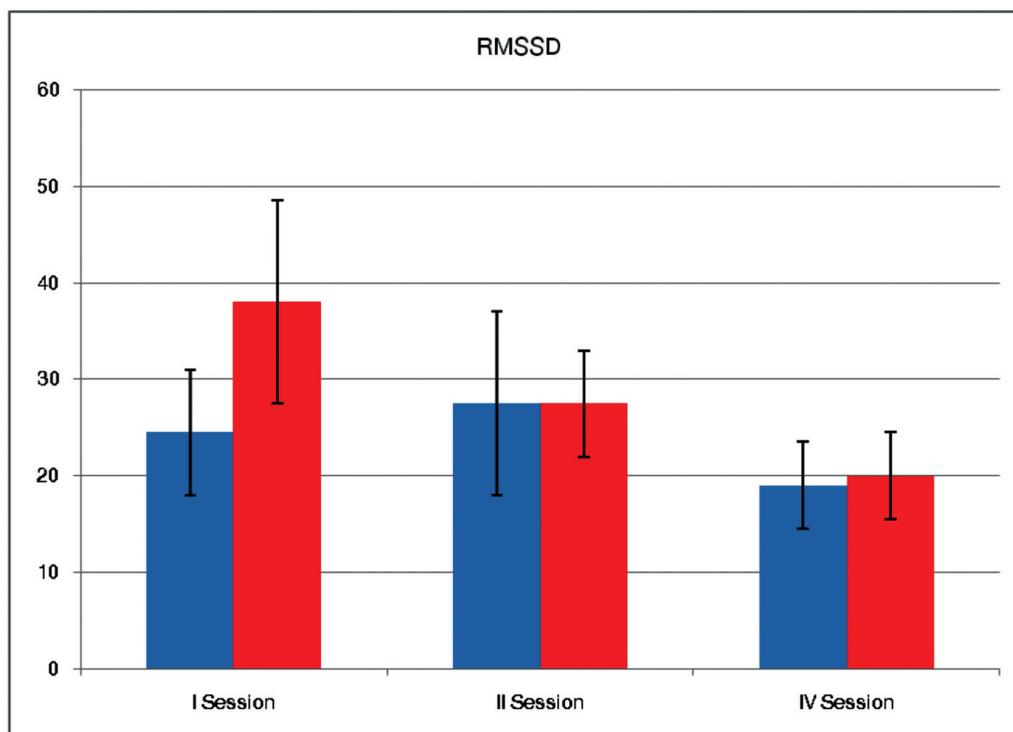


Figure 5 RMSSD variation before (blue bars) and 30 minutes after (red bars) oxygen-ozone therapy. The figure shows RMSSD variation due to oxygen-ozone therapy. RMSSD had overall a diminishing trend, even though 30 mins after every session RMSSD increased due to ozone exposure (red bars).

#### HR modification

The more the sessions, the more the mean HR was observed to increase, both the basal level ( $T_0=73.0\pm 7.8$ ;  $T_2=79.15\pm 3.1$ ;  $T_4=81.4\pm 4.85$ ) and after the therapy ( $T_1=69.40\pm 6.55$ ;  $T_3=72.2\pm 1.3$ ;  $T_5=78.4\pm 2.3$ ) (Figure 4). Mean HR decreased after every session, perhaps pointing to an activation of the vagus nerve ( $T_0$  vs.  $T_1$ ;  $T_2$  vs.  $T_3$ ;  $T_4$  vs.  $T_5$ ).

#### Root Mean Square of the Successive Differences (RMSSD)

After every session, RMSSD was observed to increase, potentially proving the activation of the vagal antiinflammatory pathway ( $T_0=24.5\pm 6.5$  vs.  $T_1=38\pm 10.5$ ;  $T_2=27.50\pm 9.5$  vs.  $T_3=27.5\pm 5.5$ ;  $T_4=19\pm 4.5$  vs.  $T_5=20\pm 4.5$ ) (Figure 5). During the first 3 sessions, basal RMSSD progressively decreased, potentially pointing to a pro-oxidant pattern activation ( $T_0$  vs.  $T_2$  vs.  $T_4$ ).

#### Discussion

This feasibility pilot study aimed to detect possible modification of functional parameters that were changeable by a systemic oxygen-ozone therapy in

a group of healthy subjects under allostatic load. The number of subjects enrolled was very low ( $N=4$ ), and the sample didn't show homogeneity for sex (3 women and 1 man), body weight, height, and BMI (Table 1). Such heterogeneity determined a high variability in the bioimpedance parameters taken, with subsequent high values of standard deviation. However, since the validity and reliability of the medical devices used in this study for measurements, the data obtained are useful to define additional hypotheses for future clinical studies; these should be carried out on a homogeneous population and with an adequate sample size. Even though the very small sample size, the heterogeneity of the subjects' measurements at  $T_0$  and the high standard deviations, data obtained showed that 4 sessions of parenteral oxygen-ozone therapy were capable of modifying psychometric indices of allostatic load (primary outcome) in apparently «healthy» subjects under allostatic load. Biological and functional parameters (secondary outcomes) regarding bioimpedance and plethysmography were also documented.

#### Allostatic load indices modification (PGWBI)

The PGWBI questionnaire<sup>18,19</sup> measures psychological and emotional wellbeing. The result obtained via the response analysis is given on

6 scales (Anxiety, Depression, General Health, Vitality, Positive Well-being, and Self-Control), each one addressing a specific aspect of the perceived psycho-emotional health. The unrefined scores are mathematically elaborated, based on both age and sex, and transformed into a value between 100 (perfect health) and 0 (worst health state possible). The higher the score, the better the perceived wellbeing. Scores below 72 show a subject under moderate allostatic load, whereas scores below 60 mean the subject is under severe allostatic load.

Data obtained in this study showed every treated subject was under moderate-severe allostatic load (“vitality” and “positive well-being” items were both below 70). After the 4 sessions of systemic oxygen-ozone therapy, an improvement in these indices was observed. This result could address a therapeutic effect of ozone after just 4 sessions.

#### *Biological and functional parameters modification under chronic stress*

Several studies exhibited improvement in biological parameters regarding oxidative stress after oxygen-ozone therapy<sup>2-6,21-29</sup>.

However, until today few studies were published regarding redox system regulation due to oxygen-ozone therapy in healthy subjects under chronic stress<sup>29</sup>, and during aging<sup>30</sup>. Some studies investigated about identifying specific functional parameters to provide evidence of the efficacy of oxygen-ozone therapy, and in fact an improvement in the HR variability (plethysmography) after ozone therapy in an animal model was documented<sup>31</sup>.

Moreover, researches evaluating body composition modifications due to oxygen-ozone therapy do not exist to our knowledge.

Recent data correlated allostatic load with functional modifications (bioimpedance and plethysmography); in particular, subjects under chronic stress exhibited body composition alterations such as increase in ECW, ECM, and fat mass, in addition to decrease in intracellular water and lean (skeletal muscle) mass<sup>14</sup>. Also, HR variability measurement correlated with chronic disease and allostatic load (mean HR, Total Power, RMSSD)<sup>11,12,16,32</sup>.

#### *Bioimpedance parameters*

Regarding bioimpedance parameters measured by BIA-CC, ECW and ECM were observed to change in different ways whether 30 mins or 72 hours after systemic oxygen-ozone therapy. In particular, ECW decreased immediately after treatment, but it reached a higher basal level after 72 hours, suggesting

different effects of the oxygen-ozone blend on the cellular membrane activity (functional improvement right after treatment, functional deterioration in the long run). The ECM alteration observed was the exact opposite: in particular, ECM% increased right after treatment (suggesting a higher inflammatory state in ECM due to therapy) for every session, but its basal level progressively decreased during the study suggesting the beginning of ECM detoxification due to the 4 therapeutic sessions.

These results could be analysed based on literature data showing that the action mechanisms of systemic oxygen-ozone therapy involve pro-oxidant pre-conditioning. In particular ozone, interacting with cellular membrane and plasma biological molecules, induces an oxidative cellular stress with formation of pro-oxidant agents (4-hydroxy-alkenal and hydrogen-peroxide), capable of facilitating activation and transcription of genes involved in the regulation of antioxidant cytoprotective mechanisms (Nrf-2, FOXOs, CREB, NF-κB), with production of antioxidant effectors (SOD, catalase, GSH, GPx, chaperonins, HSP-70, GRP78), growth factors (BDNF, VEGF, BFGF), mitochondrial proteins, calcium influx regulatory proteins, 2-3-DPG, thiobarbituric acid<sup>2-6,21-37,33,34</sup>, and consequent beneficial effects on degenerative chronic diseases<sup>4,5,35-38</sup>.

Antioxidant system activation leads to measureable pharmacological effects (improvement in oxygen release in tissues, modulation of immunity response, release of autacoids and growth factors, increase in NO, circulating stem cells, and antioxidant enzymes). Therapeutic effects of ozone could be obtained through repetitive administration of low doses capable of inducing a moderate and controlled oxidative stress, which stimulates the protective mechanisms of cells and organs and carries out a regenerative and biologically useful action<sup>23,24,33-38</sup>. Attention and caution must be paid to not exceed in the induction of oxidative stress for not surpassing the antioxidant system activation capacity; for this reason, ozone doses and concentrations (non toxic or potentially dangerous) must be personalised for every subject and gradually and progressively increased until the optimal therapeutic dose/concentration<sup>5,23</sup>. In addition, ECW and ECM scores correlates with states of allostatic load and low-grade chronic inflammation (measured through high sensibility PCR)<sup>14</sup>.

Therefore, the data obtained in this study were in agreement with pre-existent scientific literature. We can hypothesize that, during the first 3 sessions, an oxidative stress was induced which, not yet balanced by the individual antioxidant response, was defined on one hand by an increase in oxidant/inflammation,

and on the other by the presence of specific signs of initial ECM detoxification.

It is thus plausible to guess that, continuing with the oxygen-ozone therapy, more significant bioimpedance alterations could be observed (e.g. reduction in ECW, ECM, and increase in phase angle), proving the therapeutic effect of the oxidative pre-conditioning induced by ozone and the ability of this therapy to positively regulate stress axis activation. Further data are needed to confirm this trend and to outline conclusive interpretations.

#### *Photo-plethysmographic data*

The plethysmographic parameters changed after ozone therapy. Data obtained in this study showed that mean HR increased in the days after treatment, whereas it decreased right after treatment. RMSSD showed a similar behavior, since its basal level worsened among the first 3 sessions, but it improved right after the therapy.

Since the low number of either the measured parameters or the therapeutic sessions, we can formulate just a few hypotheses. Previous studies showed autonomic nervous system (ANS) deteriorates under chronic stress; the ANS plays a key role in a vast number of physical and psychic diseases: many researches proved ANS role in cardiovascular pathologies and recent data showed ANS unbalance during conditions of chronic stress or high allostatic load. A reduction of vagal activity and HR variability are associated with pro-inflammatory biochemical modifications (increase in fasting glycaemia, cortisol, pro-inflammatory cytokines such as IL-6, and acute-phase proteins such as PCR). Restoration of normal vagal tone, defined as recovering of “cholinergic anti-inflammatory pathway”, induces a positive regulation of the stress response, inhibiting pro-inflammatory and pro-oxidant mechanisms and revealing a clinical benefit either in healthy subjects or in pathological conditions. Therefore, literature data provided evidence parasympathetic tone measured via HR and RMSSD is inversely correlated with pro-inflammatory markers, and ozone therapy is capable of modulating ANS activity.

The photo-plethysmographic data obtained correlated quite well with previous studies, confirming the hypothesis made in the previous paragraph; we could observe an acute effect right after the therapeutic sessions, and another effect measurable among the sessions, as well: after every session a transient improvement of autonomic regulation was observed, whereas it worsened among the first 3 sessions. Even in this case, we can argue that non-invasive data could show the

oxidative stress induced by ozone, when it is not yet balanced by the individual antioxidant response. It is plausible to guess that, after a higher number of therapeutic sessions, we could observe a progressive and healthy improvement in the anti-inflammatory vagal indices, confirming ozone therapeutic effect.

#### **Conclusion**

The data obtained showed an improvement of the psychometric indices measuring chronic stress perception (primary outcome) after 4 sessions of systemic ozone therapy; also, secondary outcome scores (plethysmographic and bioimpedance parameters) changed showing a trend coherent with known ozone pharmacological effect from literature.

A higher number of subjects and therapeutic sessions are needed to confirm these first preliminary data, that is the possibility of providing evidence in a non-invasive way for the functional and clinical benefit following oxidative pre-conditioning induced by oxygen-ozone therapy in chronic stress conditions.

#### **Methods**

##### *Materials*

*Ozone generator.* Ozone was produced by an ozone medical generator (CE Legislation) capable of generating concentrations between 1 and 100-120 µg/mL (mg/L) (*OZO<sub>2</sub> FUTURA-ALNITEC*). Parenteral oxygen-ozone therapy was administered via a medical device compliant with FIO guidelines (guideline N. T022), with the aid of a tilting scale equipped with an electronic clamp for weight control and an i.v. stand. Ozone was collected and blended using a disposable 50 mL polypropylene syringe.

*Distress measure.* The measure of distress and allostatic load was obtained via a psychometric scale (PGWBI)<sup>18,19</sup>. The questionnaire is a validated tool for distress and life quality evaluation.

*Bioimpedance measuring instrument.* The analysis of body composition was obtained via the medical device BIA-CC Biotekna (Bioelectric Impedance Analyzer). Bioimpedance assess several parameters regarding body composition and inflammatory state in subject. In this study we assessed the following parameters: ECW and catabolites in ECM<sup>14</sup>.

*Plethysmographic measuring instrument.* Plethysmographic parameters were obtained via photo-plethysmographic (PPG) measurement using the medical device PPG Stress Flow Biotekna. Measurements taken in appropriate time according

to codified standard<sup>17</sup>, and software analysis of peripheral pulse waveform allowed to assess the HR variability (mean HR, RMSSD).

#### *Time and modality of therapy administration*

#### *Population*

#### *Sample size and subjects characteristic*

This clinical study was a phase I monocentric feasibility pilot study.

Healthy volunteers that deliberately gave their consent to participate in this study were enrolled, for a total of 4 subjects (1 man; 3 women) with a diagnosis of high allostatic load made via the PGWBI questionnaire<sup>18,19</sup>.

#### *Inclusion criteria*

High distress measured via PGWBI<sup>18,19</sup>, administration of blood chemistry exams according to FIO indications<sup>8,9</sup>, absence of known organic disease diagnosis (ICD-9-CM classification), no current medical therapy.

#### *Exclusion criteria*

No agreement to the informed consent signature, previous treatment with systemic oxygen-ozone therapy, hyper-sensibility to the oxygen-ozone mixture, presence of absolute or relative contraindications according FIO guidelines (guideline T022)<sup>8,9</sup>.

#### *Time and modality of treatment administration*

The study was carried out from 1.07.2016 to 31.07.2016.

During this time period, every subject was administered 4 sessions of parenteral systemic oxygen-ozone therapy twice weekly for two weeks.

#### *Treatment schedule*

After assessing the inclusion criteria, and obtaining the Informed Consent by every subject, the PGWBI questionnaire was administered, and the measuring of biological-functional data (BIA-CC + PPG) took place.

Later, for every subject was performed a cannulation in the basilic or cephalic vein of the arm using a cannula (18 G o 17 G) for extracting an amount of blood proportional to the body weight (mL of blood taken=1.3·kg of body weight). This blood sample was exposed to an equal volume of the oxygen-ozone mixture at the concentration of 30 µg/mL, so as to obtain the same concentration of ozone for kg of body weight in every subject.

The parenteral systemic oxygen-ozone therapy was administered according to guidelines<sup>8,9</sup>. 30 mins after the therapeutic reinfusion, bioimpedance

and photo-plethysmography measures were taken another time (BIA-CC and PPG).

#### *Study location and site where data are stored*

Ambulatorio di Terapia del Dolore. U.O.C. Cure Palliative. Istituto Scientifico Fondazione Salvatore Maugeri. Via Severino Boezio – Pavia.

#### *Assistance support (human and instrumental resources)*

The treatment was administered exclusively by physicians (MD) purposely trained to correctly use the oxygen-ozone mixture, with possible aid by paramedic and auxiliary personnel.

#### *Risks associated with the trial*

Scientific literature showed grade 1 complications (NIH2010 criteria)<sup>20</sup>, provided that the administration was carried out according to the right modality, with precise concentrations and proper doses, adequate to subject's age and clinical conditions. Higher grade complications are to ascribe to *mala praxis*.

#### *Outcome measurements*

The measurements were taken at T0 (enrolment, before oxygen-ozone therapy), T1 (30 mins after the I session), T2 (72 hours after the first session, or before the II session), T3 (30 mins after the II session), T4 (72 hours after the III session, or before the IV session), T5 (30 mins after the IV session).

The primary psychometric outcome measure (PGWBI) was taken at T0 and T4. The secondary functional outcomes measures (bioimpedance and plethysmography) were taken at T0, T1, T2, T3, T4, and T5.

#### *Statistics*

The statistical procedures used are adequate to the analysis of an observational pilot study. Descriptive statistics (median ± median absolute deviation) of every outcome measurement taken at different times in the study were given. The subjects' outcomes before and after the therapy were compared. Any potential observed statistical significance doesn't point to definitive evidence, but it useful to generate hypothesis, due to the very small number of subjects enrolled in this study and several confounding variables involved.

#### *Study approval*

The protocol was approved by the Hospital ethics committee.

Procedures used during the study are in agreement with the ethical standard of the Helsinki Declaration (1975-2005).

The anonymity of every single patient was cautiously protected; every patient signed an informed consent. The study followed the guidelines for experimental studies on humans.

#### *Acknowledgments of research support for the study*

I thank Dr Carla Campetti for her support and collaboration during the realization of the present research.

#### *Disclosure of potential conflicts of interest*

The author has declared that no conflict of interest exists.

#### *Intellectual property permissions*

The author recognises her responsibility for the manuscript integrity, assures its originality and guarantees that the manuscript doesn't contain any material previously published nor submitted for publication to another editor.

#### *Permissions*

All illustration used in this manuscript are original.

## References

- Schwartz-Tapia A, Martínez-Sánchez G, Sabah F. Madrid Declaration on Ozone Therapy. 2<sup>nd</sup> Edition. Madrid: ISCO3 (International Scientific Committee of Ozone Therapy); 2015.
- Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 2011; 1: 29.
- Re L, et al. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol.* 2014; 742: 158-162.
- Re L, Rowen R, Travagli V. Ozone Therapy and Its Use in Medicine. *Cardiology.* 2016; 134 (2): 99-100.
- Ahmed LA, Salem HA, Mawsouf MN, et al. Cardioprotective effects of ozone oxidative preconditioning in an in vivo model of ischemia/reperfusion injury in rats. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012; 72 (5): 345-354.
- Zanardi I, Borrelli E, Valacchi G, et al. Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. *Curr Med Chem.* 2016; 23 (4): 304-14.
- Babior BM, Takeuchi C, Ruedi J, et al. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (6): 3031-3034.
- ISCO3. Guidelines and Recommendations for Medical Professionals Planning to Acquire a Medical Ozone Generator. Madrid, 2014 <https://isco3.org/wp-content/uploads/2015/09/ISCO3-DEV-00-01-Guidelines-and-Recommendations-for-Medical-Professionals-Planning.pdf>. Accessed 22/10/2018.
- Forman HJ. Redox signaling: An evolution from free radicals to aging. *Free Radic Biol Med.* 2016; 97: 398-407.
- Narasimhan M, Rajasekaran NS. Exercise, Nrf2 and Antioxidant Signaling in Cardiac Aging. *Front Physiol.* 2016; 7: 241.
- McEwen BS. Biomarkers for assessing population and individual health and disease related to stress and adaptation. *Metabolism.* 2015; 64 (3 Suppl 1): S2-S10.
- McEwen BS. In pursuit of resilience: stress, epigenetics, and brain plasticity. *Ann N Y Acad Sci.* 2016; 1373 (1): 56-64.
- Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ. Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010; 35 (1): 2-16.
- Tsigos C, Stefanaki C, Lambrou GI, et al. Stress and inflammatory biomarkers and symptoms are associated with bioimpedance measures. *Eur J Clin Invest.* 2015; 45 (2): 126-134.
- Thayer JF, Sternberg E. Beyond heart rate variability: vagal regulation of allostatic systems. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1088: 361-372.
- Thayer JF, Ahs F, Fredrikson M, et al. A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neurosci Biobehav Rev.* 2011; 36 (2): 747-756.
- Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation.* 1996; 93 (5): 1043-1065.
- Grossi E, Mosconi P, Groth N, et al. Questionario Psychological General Well-Being Index. Versione Italiana. Milano: Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri. 2002.
- Wenger NK, Matson MI, Furberg CD, et al. The psychological general well-being (PGWB) index. *New York: Le Jacq Publ Inc.* 1984: 170-183.
- U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Version 4.03; 2010. [https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_5x7.pdf](https://www.eortc.be/services/doc/ctc/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_5x7.pdf). Accessed 22/10/2018.
- Pecorelli A, et al. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 267 (1): 30-34.
- Zamora ZB, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on TNF-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. *Mediators Inflamm.* 2005; 2005 (1): 16-22.
- Martínez-Sánchez G, Pérez-Davison G, Re L, et al. Ozone as u-shaped dose responses molecules (hormetins). *Dose Response.* 2010; 9 (1): 32-49.
- Martínez-Sánchez G, Delgado-Roche L, Díaz-Batista A, et al. Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease. *Eur J Pharmacol.* 2012; 691 (1-3): 156-162.
- Bocci V, Zanardia I, Valacchi G, et al. Validity of Oxygen-Ozone Therapy as Integrated Medication Form in Chronic Inflammatory Diseases. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2015; 15 (2): 127-138.
- Foglieni C, Fulgenzi A, Belloni D, et al. Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy. *BMC Nephrol.* 2011; 12: 61.
- Calunga JL, et al. Ozone therapy on rats submitted to subtotal nephrectomy: role of antioxidant system. *Mediators Inflamm.* 2005; 2005 (4): 221-227.

- 28 El-Sawalhi MM, Darwish HA, Mausouf MN, et al. Modulation of age-related changes in oxidative stress markers and energy status in the rat heart and hippocampus: a significant role for ozone therapy. *Cell Biochem Funct.* 2013; 31 (6): 518-525.
- 29 Inal M, Dokumacioglu A, Özcelik E, et al. The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. *Ir J Med Sci.* 2011; 180 (3): 703-707.
- 30 Borrelli E, Diadori A, Zalaffi A, et al. Effects of major ozonated autohemotherapy in the treatment of dry age related macular degeneration: a randomized controlled clinical study. *Int J Ophthalmol.* 2012; 5 (6): 708-713.
- 31 Di Filippo C, et al. Daily Oxygen/O<sub>3</sub> Treatment Reduces Muscular Fatigue and Improves Cardiac Performance in Rats Subjected to Prolonged High Intensity Physical Exercise. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015: 190640.
- 32 Lennartsson AK, Jonsdottir I, Sjörs A. Low heart rate variability in patients with clinical burnout. *Int J Psychophysiol.* 2016; 110: 171-178.
- 33 Viviana C, Gabriele T. Exposure to low ozone concentrations induces cytoskeletal reorganization, mitochondrial activity and nuclear transcription in epithelial human cells. *European Cooperation of Medical Ozone Societies Congress.* Zurich; 2014.
- 34 Viebahn-Hänsler R, León Fernández OS, & Fahmy Z. Ozone in Medicine: The Low- Dose Ozone Concept. Guidelines and Treatment Strategies. *Ozone Sci Eng.* 2012; 34 (6): 408-424.
- 35 Biedunkiewicz B, Tylicki L, Niewegłowski T, et al. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study. *Int J Artif Organs.* 2004; 27: 29-34.
- 36 Tylicki L, Niewegłowski T, Biedunkiewicz B, et al. Beneficial clinical effects of ozonated autohemotherapy in chronically dialyzed patients with atherosclerotic ischemia of the lower limbs--pilot study. *Int J Artif Organs.* 2001; 24: 79-82.
- 37 Costanzo M, et al. Low ozone concentrations stimulate cytoskeletal organization, mitochondrial activity and nuclear transcription. *Eur J Histochem.* 2015; 59 (2): 2515.
- 38 Clavo B, et al. Brain ischemia and hypometabolism treated by ozone therapy. *Forsch Komplementmed.* 2011; 18 (5): 283-287.

Dr.ssa Chiara Cusa  
ASST Pavia, Dipartimento di Area Medica U.O.  
Medicina Interna  
Ospedale Civile di Casorate Primo  
Via A. Dall'Orto, 99  
27022 Casorate Primo, Pavia, Italy  
E-mail: Chiara\_Cusa@asst-pavia.it

# Cistiti ricorrenti nella donna: utilizzo dell'ozonoterapia locale

PAOLO BISETTI

Specialista in Chirurgia Vascolare, Corte della Salute; Bollate, MI

**Key words:** cistiti ricorrenti, infezioni vie urinarie nella donna, ozonoterapia locoregionale

**ABSTRACT** - *La donna è particolarmente esposta alle infezioni delle vie urinarie (cistiti) soprattutto in menopausa e l'eccessivo uso di antibiotici induce resistenze all'antibioticoterapia.*

*Sono state trattate 7 donne di età compresa fra i 32 e gli 82 anni mediante cateterismo vescicale e introduzione di una miscela (50-100 cc) di ossigeno-ozono alla concentrazione di 40 mic/ml. Il trattamento è stato ripetuto per 3-4 sedute. I risultati sono stati ottimali, comprovati da urinocolture negative.*

## Introduzione

E' noto come la donna rispetto all'uomo, sia più facilmente esposta alle infezioni delle vie urinarie (cistiti in particolar modo).

Le cause principali di questa maggiore vulnerabilità sono:

- anatomiche: uretra di lunghezza ridotta, vicinanza con le strutture genitali e con lo sfintere anale
- ormonali: calo degli estrogeni con la menopausa
- stress emotivi
- igiene (soprattutto in menopausa)

A dimostrazione di quanto sopra esposto maggiormente interessate sono le donne in menopausa e le ragazze in età fertile ma con cicli mestruali irregolari o addirittura non ancora consolidati.

La frequenza di cistiti in menopausa può toccare il 15% della popolazione femminile.

A fronte di molti casi in cui al singolo episodio di cistite non fanno seguito ulteriori riacutizzazioni va detto che spesso esiste una esacerbazione del problema.

Nella maggioranza di questi ultimi casi le pazienti hanno fatto uso per molto tempo di antibiotici di diversa origine e per periodi di tempo più o meno prolungati pur coerenti ai referti degli esami colturali e ai relativi antibiogrammi.

Gli antibiotici più frequentemente utilizzati sono: Nitrofurantoina, Ac. nalidixico, Norfloxacin, Amoxicillina/ Ac. Clavulanico, Ciprofloxacina, Cotrimoxazolo.

Si tratta quindi di soggetti che hanno nel tempo

sviluppato antibiotico-resistenze e che si trovano in condizioni di frustrazione per non aver potuto risolvere il loro problema.

Anche lo stress psicologico fa la sua parte ed espone ad ulteriori recrudescenze infettive.

Le cistiti costituiscono anche un problema sociale. I disturbi ad esse correlate possono portare ad un numero considerevole di giornate lavorative perse: i dati INPS parlano del 25% delle assenze.

L'aspetto psicologico fa la sua parte perché non è dato sapere quando si presenterà il nuovo episodio di cistite. Ne consegue che spesso si va incontro anche ad un isolamento dal mondo esterno.

I germi più frequentemente coinvolti sono l'Escherichia Coli, l'Enterococco Fecalis e la Klebsiella.

## Razionale della tesi

Le proprietà battericide, fungicide e virus-statiche dell'ozono sono ben note e documentate.

Non solo viene utilizzato da molto tempo nella bonifica delle acque nere, come alternativa al cloro nelle piscine e per il trattamento dei gas di scarico industriali, ma già dai primi anni del novecento il suo utilizzo si è allargato in campo umano per il trattamento delle ferite e delle ulcere infette.

A livello umano le vie di somministrazione e/o le modalità di applicazione dell'ozono variano in funzione della sede e della migliore performance.

Dalla terapia sistemica all'utilizzo di acqua ozonizzata, all'uso di sacchetti da applicare per

esempio alle estremità che prima vengono svuotati dal contenuto di aria e poi riempiti con la miscela di ossigeno/ozono.

Non ultima va ricordata la somministrazione della miscela gassosa (ossigeno/ozono) direttamente nella sede da trattare. Questa modalità risulta particolarmente interessante per esempio per trattare tragitti fistolosi nelle sedi più varie.

Nasce così l'idea di utilizzare l'ozono anche per le infezioni recidivanti delle vie urinarie, in particolar modo vescicali, nelle pazienti che sono da tempo affette da questa fastidiosa e invalidante patologia.

### Casistica

Sono state trattate 7 pazienti di età compresa fra i 32 e gli 82 anni con età media di 62,4.

La somministrazione di ozono è avvenuta mediante cateterismo vescicale estemporaneo con catetere in PVC del diametro di 4 mm.

Solo in un caso si è utilizzato il catetere già presente in vescica per esiti di cistectomia.

Dopo aver svuotato il residuo di urina si è proceduto all'insufflazione di 50/60 cc di miscela ossigeno/ozono ad una concentrazione di 35/40 µg/ml.

Una seconda insufflazione è stata eseguita dopo alcuni minuti dalla prima alla stessa concentrazione.

La cadenza del trattamento è stata settimanale.

Il cateterismo è stato eseguito senza complicanze e l'insufflazione è stata ben tollerata.

Solo nel caso della paziente più giovane alla prima applicazione è seguita la comparsa di tenesmo e stranguria di discreta intensità, durata qualche ora e regredita con la somministrazione di paracetamolo (1000mg).

### Casi clinici

#### Caso 1

A.R. Femmina di anni 58.

2 figli, in menopausa da tre anni. Fin da ragazza, pur a fasi alterne, soffre di cistiti con ridotta frequenza degli episodi durante l'età fertile e soprattutto durante le gravidanze e l'allattamento.

Dall'inizio della menopausa esacerbazione degli episodi sia come intensità che come frequenza.

Le urinocolture hanno dimostrato la presenza di Escherichia Coli e in 2 occasioni di Klebsiella.

Sono stati eseguiti diversi cicli con antibiotici che risolvevano il quadro clinico solo per un breve periodo.

Viene praticata una prima seduta di ozonoterapia

(ottobre 2010) mediante insufflazione di 50 cc di miscela ossigeno/ozono alla concentrazione di 40 µg/ml previa cateterizzazione con catetere in PVC di 4,0 mm di diametro.

Già dopo la prima applicazione riferisce discreto miglioramento della sintomatologia. Dopo la seconda applicazione eseguita dopo 7 giorni viene riferita completa regressione della sintomatologia. Segue una terza applicazione dopo una settimana. Viene successivamente effettuata una urinocoltura che risulta negativa.

#### Caso 2

S.R. femmina di anni 63.

2 gravidanze. In menopausa da tre anni.

Dall'inizio della menopausa (59 anni) iniziano episodi di cistite ricorrente di cui il primo trattato con antibiotico non precisato senza esame colturale.

Solo in occasione del secondo episodio esegue urinocoltura che dimostra la presenza di Escherichia Coli; il trattamento antibiotico che segue risulta in funzione dell'antibiogramma.

Giunge all'osservazione nel novembre 2017 dopo l'ennesimo insorgere dei disturbi vescicali.

Esegue trattamento locale con ozono. Al controllo dopo una settimana la sintomatologia legata alla cistite risulta migliorata; compare invece manifestazione erpetica in sede labiale (Herpes Simplex). All'applicazione locale si aggiunge quindi un trattamento sistemico (prelievo di 200 cc di sangue che viene miscelato con una uguale miscela di ossigeno/ozono alla concentrazione di 50 µg/ml).

La doppia somministrazione viene effettuata anche alla terza e alla quarta seduta distanziate fra loro di una settimana.

Dopo un mese dall'inizio della sintomatologia si registra una completa guarigione sia della cistite che della manifestazione erpetica.

Ad oggi la paziente risulta asintomatica per entrambi i problemi.

#### Caso 3

A.C. femmina di anni 50. 1 gravidanza. Cicli regolari.

Anamnesi negativa per pregressi episodi di cistite.

Nel maggio 2017 in conseguenza di una virosi intestinale caratterizzata da diarrea e vomito che si protraggono per alcuni giorni, probabilmente in funzione di un quadro di disidratazione, insorge disuria con urine maleodoranti. L'esame con stick delle urine rivela presenza di ematuria (+++). Era già in corso terapia antibiotica con amoxicillina e

acido clavulanico (1 gr 2 volte al dì). L'urinocoltura dimostra la presenza di Escherichia Coli ma con una carica batterica inferiore alle 100.000 colonie e resistente all'antibiotico in corso (che viene sospeso).

Il nefrologo sconsiglia di intraprendere un nuovo ciclo di antibiotico-terapia vista la relativamente bassa carica batterica. Il decorso prosegue con parziale regressione del quadro clinico legato anche alla ripresa di una normale idratazione. Peraltro ogni 7-10 giorni compaiono urine maleodoranti e scure con stick positivo per ematuria. Al manifestarsi del terzo episodio la paziente decide di intraprendere l'ozonoterapia che le era stata consigliata in precedenza.

L'applicazione avviene secondo lo schema precedentemente esposto: 2 insufflazioni ravvicinate a distanza di pochi minuti l'una dall'altra di circa 50 cc ad una concentrazione di 40 µg/ml previa cateterizzazione vescicale. L'insufflazione viene ben tollerata e ripetuta dopo 5 giorni.

Viste le condizioni generali e la ripresa di un pieno benessere viene ripetuta una terza applicazione dopo una settimana. Prima di quest'ultima esegue urinocoltura che risulta negativa.

Ad oggi non ci sono più state manifestazioni cistitiche.

#### Caso 4

S.Y. femmina di anni 32. Nullipara. Cicli irregolari.

Ha sofferto in passato di disturbi dell'alimentazione caratterizzati da anoressia alternata a bulimia. A questi, come spesso capita, si sono associati periodi di amenorrea.

Da circa tre anni lamenta frequenti episodi di cistite trattati con antibiotici di diversa origine in funzione dell'antibiogramma (Escherichia Coli, Klebsiella).

Effettua una prima seduta di ozonoterapia il 20 marzo 2018 secondo il solito protocollo: 50 cc di miscela ossigeno/ozono a 40 µg/ml mediante cateterismo vescicale. Una seconda applicazione viene eseguita a distanza di pochi minuti.

La paziente dopo poche decine di minuti lamenta senso di tensione vescicale con stimolo alla minzione. Non riuscendo a trattenersi svuota la vescica ma con dolenzia importante. Nelle ore successive la sintomatologia regredisce con l'uso di paracetamolo (1000 mg).

La seconda applicazione viene eseguita a distanza di una settimana. La paziente era molto titubante vista la precedente esperienza. Si è deciso di abbassare la concentrazione a 30 µg/ml. Questa seconda seduta non ha provocato disturbi particolari.

Da allora non ha più manifestato sintomatologia

riferibile a cistite. Le è stata consigliata un'urinocoltura che non ha ancora effettuato.

#### Caso 5

S.A. femmina di 82 anni.

Da molto tempo, probabilmente dall'inizio della menopausa, pur a fasi alterne soffre di episodi cistitici.

Nel corso degli anni sono stati eseguiti esami colturali che hanno sempre dimostrato la presenza di Escherichia Coli o di Enterococco fecalis. Gli antibiotici somministrati hanno solo temporaneamente tamponato la sintomatologia ma gli episodi si sono poi ripresentati con frequenza alterna.

Consigliata dal medico curante una valutazione per l'ozonoterapia veniva presa in carico e sottoposta a trattamento locale mediante cateterismo vescicale e successiva introduzione di 100 cc di ossigeno/ozono alla concentrazione di 40 µg/ml in due somministrazioni ravvicinate.

A questa prima seduta effettuata nell'autunno 2017 ne seguivano altre due a distanza di una settimana l'una dall'altra. Dopo l'ultima veniva eseguita urinocoltura che dimostrava l'assenza di ulteriori contaminazioni.

Ad oggi non ci sono più stati episodi di cistite.

#### Caso 6

F.M. paziente di anni 70.

Nel 2016 intervento di vulvectomia per melanoma infiltrante, uretrectomia parziale con epicistectomia, linfadenectomia pelvica; portatrice di catetere vescicale a permanenza tipo Foley.

Presenza di fistola vescico-vaginale. Per tale motivo proposto intervento di deviazione delle vie urinarie che la paziente al momento ha rifiutato.

La presenza di fistola oltre al catetere sono causa di episodi cistitici continui che la paziente tratta con antibiotici e FANS.

Dal marzo 2018 iniziata ozonoterapia mediante insufflazione di 50 cc di miscela ossigeno/ozono a 40 µg/ml in due riprese a distanza di qualche minuto l'una dall'altra.

Le terapie, a cadenza settimanale, sono risultate efficaci a rimuovere la sintomatologia dolorosa e ad interrompere l'uso di antibiotici.

Attualmente la paziente ricorre all'ozonoterapia ogni 3 settimane.

#### Caso 7

Paziente di 81 anni soffre da alcuni anni di cistite.

In età fertile e nei primi mesi della menopausa non ha mai sofferto di cistite.

Si presenta con la sintomatologia riferita nel mese di luglio 2018 e viene sottoposta a tre sedute di ozonoterapia secondo il protocollo citato.

L'urinocoltura eseguita alla fine del ciclo è risultata negativa. Ad oggi non si sono manifestati episodi di riacutizzazione.

### Considerazioni conclusive

Gli effetti benefici dell'ozonoterapia endovescicale sono stati sorprendenti.

Oltre a non aver manifestato effetti collaterali tutte le pazienti hanno ottenuto un netto miglioramento se non una vera e propria guarigione.

La stessa cosa si può dire al riguardo della signora portatrice di cistostomia e di fistola vescico-vaginale che non fa più uso di analgesici né di antibiotici.

La speranza e l'obiettivo è quello di mantenere il più possibile sterile l'ambiente vescicale e di confidare che l'utilizzo di ozono ogni 2-3 settimane favorisca la chiusura della fistola.

In 6 pazienti su 7 al momento non si sono manifestate recidive. Pur considerando il follow-up di media durata (6 mesi) pur tuttavia va tenuto conto che la media degli episodi di cistite era di 3/4 ogni anno.

E' intendimento di aumentare la casistica in modo

da fornire dati più considerevoli dal punto di vista numerico.

Sembra comunque di primaria importanza segnalare un dato proveniente dall'OMS legato in modo particolare alle antibiotico resistenze: nel 2050 la prima causa di morte sarà legata ai superbatteri, cioè a tutte quelle forme patogene in grado di resistere all'antibioticoterapia.

Ecco che l'ozonoterapia non può che rappresentare un valido contrasto a questo pericolo e pertanto dovrebbe essere più spesso proposta e attuata.

Nel contesto del lavoro svolto si ritiene che la semplicità della metodica e l'assenza di effetti collaterali possa rappresentare una indicazione a riproporre tranquillamente la terapia qualora si manifestassero segni clinici di riacutizzazione.

### Conclusioni

*Endovescicale sono stati sorprendenti*

Oltre a non aver manifestato effetti collaterali si sono evidenziati benefici in tutte le pazienti compresa quella portatrice di cistostomia. In 6 pazienti su 7 al momento non si sono manifestate recidive :follow up medio di 6 mesi (ancor breve ma significativo).

### Bibliografia

- 1 Armelle J. Recurrent cystitis: no medicine preventive means. Prog.Urol. 2017 Nov; 27.
- 2 Guglietta A. Recurrent urinary tract infections in women: risk factors, etiology, pathogenesis and prophylaxis. Future Microbiol. 2017 Mar; 12: 239-246.
- 3 Kuzmenko AV, Kuzmenko VV, Gyaurgiev TA.Chronobiological approach to managing an exacerbation of chronic recurrent cystite. Urologia. 2017 Jun; (2): 60-65.
- 4 Ibishev KhS. Some aspects of the treatment of persistent lower urinary tract infections in women. Urologiia, 2014 Sept-Oct; (5): 30-2, 34.

Dott. Paolo Bisetti  
Specialista in Chirurgia Vascolare  
Via Solata 10 - 24129 Bergamo  
Studio: Corte della Salute  
Via Magenta 61  
20021 Bollate (MI)  
Tel.: +39 02 3501312  
Mobile: +39 338 4476134  
E-mail: paolobisetti54@gmail.com

# Percutaneous Ozone Treatment for Herniated Lumbar Discs: 1-Year Follow-up of a Multicenter Pilot Study of a Handheld Disposable Ozone-Generating Device. Clinical Study

ANUJ BHATIA<sup>1</sup>, PETER MUNK<sup>3</sup>, DONALD LEE<sup>4</sup>, GAVIN ELIAS<sup>2</sup>, KIERAN MURPHY<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anesthesia, <sup>2</sup> Joint Department of Medical Imaging, University Health Network, University of Toronto; Toronto, Ontario, Canada; <sup>3</sup> Department of Radiology, Vancouver General Hospital, University of British Columbia; Vancouver, Canada; <sup>4</sup> Department of Radiology, London Health Sciences Center; London, United Kingdom

**Key words:** ozone treatment, herniated disk, intradiscal ozone, ozone therapy

**ABSTRACT** - Purpose: To evaluate the safety and efficacy of oxygen-ozone treatment delivered via a novel, handheld ozone-generating device for improving pain and function in herniated disc patients.

**Materials and Methods:** A total of 39 patients with contained herniated lumbar discs received oxygen-ozone treatment at 1 of 3 centers. Treatment consisted of injection of 2% ozone (10 mL): 3 mL delivered into the nucleus pulposus and 7 mL delivered into the adjacent paravertebral tissues. The first 8 patients received only ozone injections, whereas subsequent patients also received peri-ganglionic methylprednisolone (40 mg) and 0.5% bupivacaine (1 mL) injections. Patients were evaluated at baseline and at 1 month, 6 months, and 12 months after treatment using the Oswestry Disability Index (ODI) and the Visual Analogue Scale (VAS) for leg pain and for back pain. Analgesic medication use was also assessed at each timepoint.

**Results:** Overall, 91% (32/35) of the per-protocol patients (those who completed follow-up and did not have significant protocol deviations) showed detectable improvement in ODI at 1-month follow-up; this increased to 93% (26/28) of patients at 12-months follow-up. At 1 month after treatment, 60% (21/35) of patients showed significant improvement in ODI scores ( $P = .01$ ); 54% (19/35) showed significant improvement in VAS scores for leg pain ( $P = .05$ ); and 49% (17/35) showed significant improvement in VAS scores for back pain ( $P = .12$ ). At 6 months after treatment, 67% (22/33) of patients showed significant improvement in ODI scores ( $P = .02$ ); 64% (21/33) showed significant improvement in VAS scores for leg pain ( $P = .01$ ); and 52% (17/33) showed significant improvement in VAS scores for back pain ( $P = .12$ ). At 12 months after treatment, 68% (19/28) of patients showed significant improvement in ODI scores ( $P < .01$ ); 64% (18/28) showed significant improvement in VAS scores for leg pain ( $P < .01$ ); and 61% (17/28) showed significant improvement in VAS scores for back pain ( $P = .09$ ). Leg pain typically subsided more quickly than back pain. Use of analgesic medications also significantly decreased at all follow-up timepoints compared to baseline ( $P < .01$ ). There were no adverse events or device-related issues.

**Conclusions:** At 1, 6, and 12 months after treatment, patients experienced significant improvements in pain and function as well as significantly decreased use of analgesic medication. Taken together with the absence of adverse events at 1-year follow-up, these data suggest that oxygen-ozone treatment is a safe and effective therapy for contained herniated discs.

## Abbreviations

ODI = Oswestry Disability Index,  
VAS = Visual Analogue Scale

Published on: *J Vasc Interv Radiol*, vol. 30, issue 5, pp. 752-760, May 2019. © SIR, 2018  
<https://doi.org/10.1016/j.jvir.2018.09.037>

## Percutaneous Ozone Treatment for Herniated Lumbar Discs

Herniated intervertebral discs—the extrusion of nucleus pulposus tissue through a tear in the encircling annulus fibrosis—cause a range of morbidities by impinging on and compressing adjacent spinal

nerve roots<sup>1,2</sup>. They are also understood to engender chemical irritation and sensitization of nerve roots through cytokine-dependent inflammatory responses<sup>3,4</sup>. Most frequently located posterolaterally in the lumbar spine<sup>1</sup>, herniated discs constitute the leading cause of sciatica and a major cause of back pain and disability in general<sup>5,6</sup>.

Treatment of herniated discs ranges from noninvasive pharmacotherapy and physiotherapy to full-fledged surgical discectomy, which entails partial removal of the nucleus pulposus<sup>7</sup>. Although surgery can alleviate otherwise refractory disc pain<sup>8</sup>, high rates of complications like infection, recurrent herniation, and epidural scar formation<sup>9,10</sup> have increasingly encouraged the use of alternative, minimally invasive methods. These include aspiration discectomy<sup>11</sup>, laser discectomy<sup>12</sup>, radiofrequency nucleoplasty<sup>13</sup>, intradiscal electrothermal therapy<sup>14</sup>, chemonucleolysis<sup>15</sup>, and periganglionic corticosteroid injection<sup>16</sup>. Like traditional discectomy, most of these modalities are understood to relieve pain by decompression (via physical removal, fibrosis, or chemical breakdown of disc material) of entrapped spinal nerve roots<sup>2,5</sup>. By contrast, corticosteroids presumably suppress the inflammatory component of disc pain<sup>16</sup>.

Intradiscal oxygen-ozone treatment—the injection of an oxygen-ozone gas mixture into the nucleus pulposus—is yet another percutaneous intervention for herniated discs<sup>17</sup>. This therapy is well established in Europe, and substantial work<sup>2,17-23</sup>, including meta-analyses of the relevant literature<sup>24,25</sup>, evinces its safety and effectiveness in relieving pain and improving function. Oxygen-ozone treatment’s mechanism of action in reducing discogenic pain is understood to involve breakdown of disc proteoglycans leading to dehydration and reduction of disc volume, as well as modulation of inflammatory cytokines and prostaglandins<sup>2,26-29</sup>. This more specific mechanism may prevent ozone from irreversibly harming nucleus pulposus disc cells and expediting disc degeneration, potentially lowering the risk of complications like spondylosis<sup>27</sup>. Indeed, histologic animal model work has shown oxygen-ozone treatment to be less destructive to the nucleus pulposus than other percutaneous discectomy methods<sup>27</sup>, while long-term clinical follow-up studies suggest that ozone-treated discs remain hydrated and lose less height than surgically treated discs<sup>18</sup>.

This multicenter pilot study sought to affirm existing clinical evidence by exploring the safety and efficacy of image-guided oxygen-ozone therapy using a novel, hand-held ozone-generating device in a North American health-care setting. Specifically, it prospectively investigated this treatment’s effect on

pain and function scores, as well as potential adverse events, in patients with contained herniated lumbar discs.

## Materials & Methods

### Study Design

This study was designed as a multicenter, single-arm, prospective clinical trial. After research ethics board and Health Canada approval, patients were recruited and underwent oxygen-ozone treatment at 1 of 3 Canadian tertiary care centers (Vancouver General Hospital, Toronto Western Hospital, and London Health Sciences). Patients received both pre-procedural baseline evaluations and post-procedural, pre-discharge evaluations on the day of treatment. Subsequent evaluations occurred 1 month, 6 months, and 1 year after treatment to quantify changes in pain and function and to monitor for potential adverse events.

### Patient Selection

Patient recruitment began in September 2012 and concluded in February 2015. The last 1-year follow-up was completed on April 14, 2016. The study cohort comprised consecutive herniated disc patients who met specific inclusion/exclusion criteria (Table 1). Over 500 patients were screened for study

**Table 1** Inclusion and Exclusion Criteria

#### *Inclusion criteria*

- 18-75 years of age
- Single-level disc herniation between L1 and S1 evident on diagnostic imaging (CT/MR)
- Lower back pain and/or mild sciatica exacerbated by sitting and/or standing with recumbent relief based on patient questioning
- Low back pain with or without radicular symptoms that did not improve after conservative therapy for at least 3 months
- Able and willing to return for the 1-month follow-up evaluation

#### *Exclusion criteria*

- Previous spine surgery evident on CT/MR
- Multi-level disc herniation
- Abnormal neurological exam indicative of cord compression or cauda equina syndrome evident on baseline neurological exam
- Structural deformities (eg, spondylolisthesis, vertebral canal stenosis, spinal fracture, scoliosis, disc herniations >4 mm, sequestered herniation) evident on CT/MR
- Extruded/free disc fragment evident on CT/MR
- Calcified disc fragment evident on CT/MR
- Disc height loss >75% evident on CT/MR
- Infection as evidenced by patient clinical evaluation, history, and blood test
- Uncontrolled/acute illness
- Women who are known or suspected to be pregnant
- Worker’s compensation, injury litigation, disability remuneration
- Participation in another clinical investigation or course of care that may confound the outcome of this study
- Patients whose L5-S1 disc is not accessible. Disc accessibility may not be evident until the procedure is underway
- Platelet count >50,000, INR <1.4, PTT <1.3, WBCC >12,000

CT = computed tomography; INR = international normalized ratio; MR = magnetic resonance; PTT = partial thromboplastin time; WBCC = white blood cell count.

inclusion; of these, approximately 460 met 1 or more exclusion criteria and consequently failed screening. Ultimately, 39 patients were enrolled and underwent treatment. All participating patients provided informed consent prior to enrollment.

*Patient Information*

A total of 39 patients ranging in age from 20 to 64 years (mean, 45.1 ± 11.8 years) received oxygen-ozone treatment. Of these patients, 24 (61.5%) were treated at Vancouver General Hospital, 13 (33.3%) at Toronto Western Hospital, and 2 (5.1%) at London Health Sciences. Twenty-five patients (64.1%) were male and 14 patients (35.9%) were female. Twenty-one patients (53.8%) had herniated discs at the level of L5-S1, 17 patients (43.6%) at the level of L4-L5, and 1 patient (2.6%) at the level of L3-L4. The duration of low back pain or radicular pain prior to treatment ranged from 3 to 72 months (mean, 22.9 ± 18.1 months) (Table 2).

*Ozone Generation*

The ActiveO (Salt Lake City, Utah) AO-1000 handheld, disposable, ozone-generating device was used to generate and deliver ozone gas in all cases (Figure 1). Briefly, the operator first drew up 10 mL of medical-grade oxygen (>99% purity) into the device from a surgical or anesthetic source. Subsequent activation of the device ionized this oxygen and within 30 seconds produced a 10-mL gas mixture comprising approximately 2% (by weight) ozone in 98% oxygen (30 µg/mL). Devices were returned to the manufacturer after each procedure to verify the oxygen-ozone mixture concentration using a calibrated In-USA Mini Hi-Con UV ozone analyzer (In-USA Inc, Norwood, Massachusetts).

*Treatment Technique*

Each patient was prepared per standard hospital procedures and positioned in the prone position on a computed tomography (CT) scanner table or biplanar angiofluoroscopy table. At Toronto Western Hospital and London Health Sciences (15 patients) but not Vancouver General Hospital (24 patients; due to a lack of available nursing support), patients were maintained under conscious sedation. Skin and deep tissues at the puncture site were locally anesthetized with 1% lidocaine using sterile technique. Under CT or angiofluoroscopy guidance, a 15 cm-long, 20 or 22-gauge Chiba needle was then percutaneously inserted into the nucleus pulposus of the target disc using a posterior paravertebral oblique approach (Figure 2). The handheld ozone-generating device



Figure 1 The handheld, disposable, ozone-generating device used to produce and deliver ozone gas for each treatment.

was attached to a medical oxygen line and filled with 10 cc of oxygen. The device was then removed from the line, depressurized to atmospheric pressure, and activated. Once the oxygen-ozone mixture had been generated, the device was attached to the pre-placed Chiba needle, and a target volume of 2-3 cc of oxygen-ozone gas was slowly injected into the disc. The needle was moved back and forth within the disc during injection to create channels for ozone penetration. The needle was then repositioned just outside the disc annulus, and up to 7 cc of the remaining mixture was injected into nearby paravertebral tissues. Once the 10-cc dose of oxygen-ozone gas was delivered, the device and needle were removed. Thirty-one of 39 patients subsequently received an injection into the periganglionic region of 40 mg of methylprednisolone and 1 mL of 0.5% bupivacaine. The initial 8 patients were treated without corticosteroid or local anesthetic injection and reported some pain during the procedure, prompting this protocol change to improve patient comfort. Patients were then bandaged and transferred to the recovery area. Upon recovery (typically within 1 hour), a lower extremities neurological exam was performed to rule out any adverse effects. Procedural success was postoperatively determined by CT or

**Table 2** Patient Demographics and Baseline Characteristics

**Total number of patients = 39**

	Number of Patients	Percentage of Patients
<i>Study Site</i>		
Hospital C	24	62.5%
Hospital A	13	33.3%
Hospital B	2	5.1%
<i>Sex</i>		
Male	25	64.1%
Female	14	35.9%
<i>Race</i>		
Asian	2	5%
Black	1	3%
Caucasian	31	79%
Other	4	10%
Unspecified	1	3%
<i>Disc Level Treated</i>		
L3-L4	1	2.6%
L4-L5	17	43.6%
L5-S1	21	53.8%

	Average / *Median	Standard Deviation / ‡ Range	Minimum	Maximum	Distribution
Age (years)	45	12	20	64	Normal
Body Mass Index	*27.0	‡32.2	19.4	51.6	Non-normal
Duration of Symptoms Prior to Treatment (months)	*17	‡69	3	72	Non-normal
Pretreatment ODI (%)	51	11	26	74	Normal
Pretreatment Leg VAS (mm)	*61	‡52	40	92	Non-normal
Pretreatment Back VAS (mm)	61	21	0	96	Normal

ODI = Oswestry Disability Index; VAS = Visual Analogue Scale.  
 \*Median - ‡ Range

cone-beam CT confirmation of gas distribution within the target disc.

Patients whose pain or function did not improve to a tolerable level during follow-up were given the option of receiving a second oxygen-ozone treatment.

*Primary Analyses: Pain Relief and Functional Improvement*

Oswestry Disability Index (ODI)<sup>30</sup> and Visual Analogue

Scale (VAS)<sup>31</sup> questionnaires were used to assess patient pain and function. ODI scores constituted this study’s primary efficacy endpoint, while VAS questionnaires were used to parse regional leg and back pain improvement. Significant ODI improvement was defined as a  $\geq 13$ -point change as per the minimum detectable change<sup>32</sup>, while significant VAS improvement was defined as a  $\geq 20$ -mm change according to the minimum clinically important dif- ference<sup>33</sup>. Patients were

assessed with both question- naires during baseline evaluation and were subsequently assessed at 1 month, 6 months, and 1 year after treatment. Neither outcome questionnaires nor follow-up schedules were changed during the course of the study. Missing follow-up scores due to patient dropouts were assumed to be equal to the last obtained score. In the event that a patient required a second treatment due to continued or recurrent pain or lack of improvement, an additional questionnaire evaluation was conducted 1 month, 6 months, and 1 year after the second treatment.

*Secondary Analyses*

Change in analgesic medication (including over-the-counter analgesics of any kind) use was another secondary efficacy endpoint. Medication use was dichotomized (ie, “yes” if they used any medication or “no” if they did not use any medication) and assessed at baseline and at 1 month, 6 months, and 1 year after treatment. This endpoint was deemed

**Table 3** Pain and Function Improvement Summary Statistics

<b>1 Month Follow-up – 35 Patients Included in Follow-up</b>			
	<i>ODI (%)</i>	<i>Leg VAS (mm)</i>	<i>Back VAS (mm)</i>
Baseline Mean Score ± SD	50.7 ± 11.3	61.8 ± 15.8	60.8 ± 20.2
Follow-up Mean Score ± SD	31.4 ± 18.2	35.5 ± 23.8	35.1 ± 21.7
Mean Improvement ± SD ( <i>P</i> value)	19.3 ± 15.1 ( <i>P</i> < .01)	26.3 ± 22.0 ( <i>P</i> < .05)	25.7 ± 27.6 ( <i>P</i> = .12)
Percentage of Patients with Improvement greater than MCID and MDC	60%	54%	49%
Percentage of Patients Showing Improvement	91%	83%	86%
<b>6 Month Follow-up – 33 Patients Included in Follow-up</b>			
Baseline Mean Score ± SD	50.5 ± 11.4	62.0 ± 16.2	60.3 ± 20.7
Follow-up Mean Score ± SD	30.1 ± 21.6	30.6 ± 26.0	34.3 ± 27.7
Mean Improvement ± SD ( <i>P</i> value)	20.4 ± 19.5 ( <i>P</i> = .02)	31.4 ± 27.1 ( <i>P</i> = .01)	26.1 ± 28.6 ( <i>P</i> = .12)
Percentage of Patients with Improvement greater than MCID and MDC	67%	64%	52%
Percentage of Patients Showing Improvement	85%	88%	76%
<b>1 Year Follow-up – 28 Patients Included in Follow-up</b>			
Baseline Mean Score ± SD	48.9 ± 10.6	62.3 ± 16.0	60.5 ± 21.5
Follow-up Mean Score ± SD	23.3 ± 17.8	27.2 ± 27.4	31.3 ± 28.9
Mean Improvement ± SD ( <i>P</i> value)	25.6 ± 19.2 ( <i>P</i> = .001)	35.1 ± 29.9 ( <i>P</i> = .006)	29.2 ± 34.8 ( <i>P</i> = .09)
Percentage of Patients with Improvement greater than MCID and MDC	68%	64%	61%
Percentage of Patients Showing Improvement	93%	86%	68%

MCID = minimally clinically important difference; MDC = minimal detectable change; ODI = Oswestry Disability Index; SD = standard deviation; VAS = Visual Analogue Scale.

successful if the proportion of patients using analgesic medication significantly decreased from baseline (Table 3).

Additional secondary analyses were conducted to: determine the success rate of patients requiring a second oxygen-ozone treatment; investigate correlations between outcome measures and duration of pain prior to surgery; compare mean improvement between patients who received corticosteroid and local anesthetic injections (31 patients) and those who did not (8 patients); compare mean improvement between patients who received conscious sedation (15 patients) and those who did not (24 patients); and compare observed mean improvement with that reported in prior oxygen-ozone trials.

*Statistical Methods*

Paired 1-tailed *t*-tests (for normally distributed data) or Wilcoxon signed-rank tests (for non-normal distributions) were performed to investigate

whether changes in pain and function score differed from the preselected significant improvement criteria (13 points ODI improvement or 20 mm VAS improvement). A 1-tailed exact binomial test was employed to evaluate change in analgesic medication use after oxygen-ozone therapy by comparing the proportion of patients taking medications at baseline against the proportion at each follow-up point (alternative hypothesis: follow-up medication use is less than pretreatment medication use). Analysis of variance of a linear regression model was used to test for correlation between duration of pain prior to treatment and pain and function score changes, while unpaired *t*-tests were performed to compare mean improvement between patient groups that underwent different variations of the treatment procedure. Analyses were performed with JMP Software (SAS Institute, Inc, Cary, North Carolina) version 13.1.0 and Microsoft Excel version 14.0.6129.5000 (Microsoft Corp, Seattle, Washington). A significance threshold of .05 was used for all analyses.

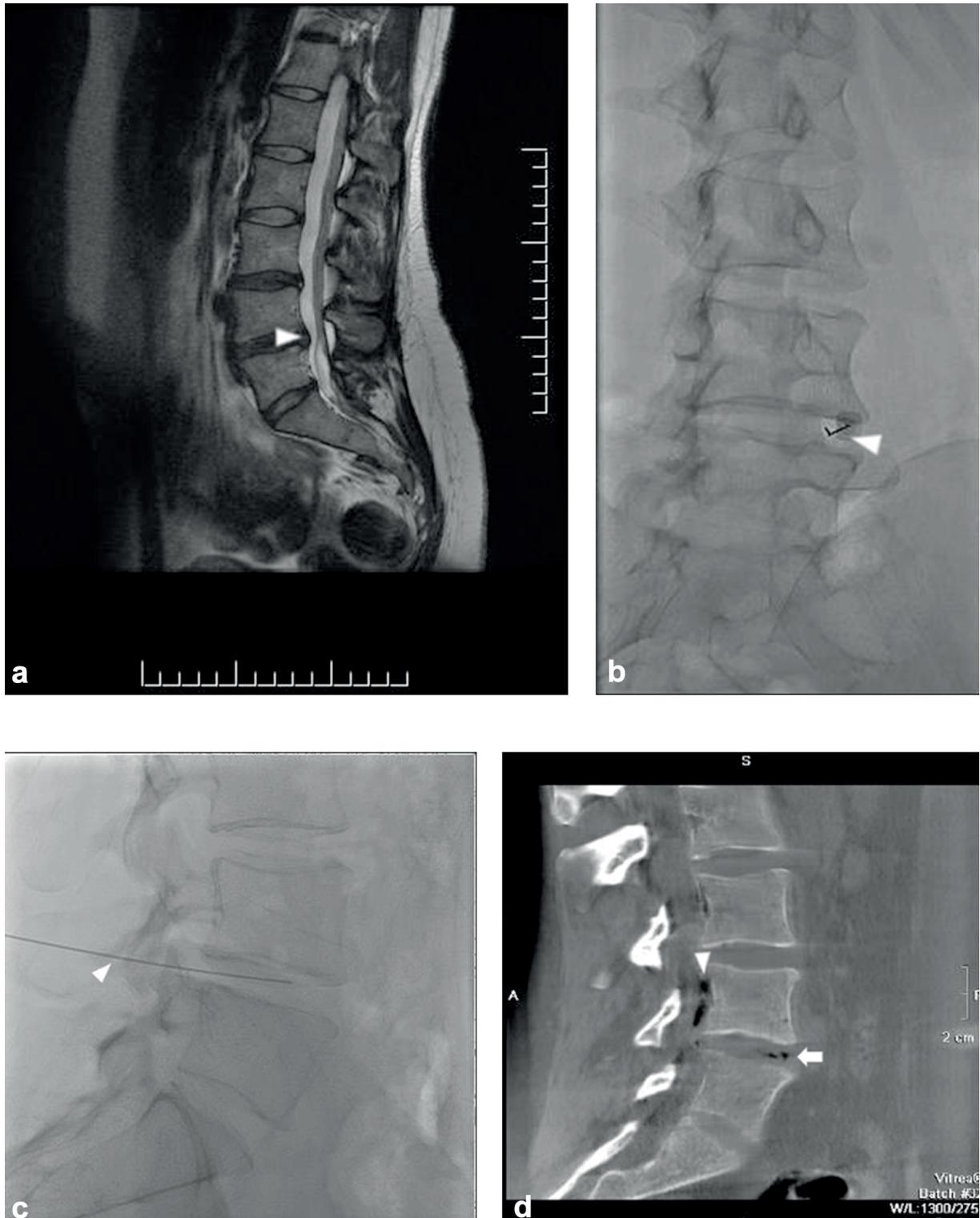


Figure 2 (a) Sagittal T2-weighted magnetic resonance imaging showing a broad L4-L5 disc bulge and annular tear (arrowhead) compressing the L5 nerve root and narrowing the L4-5 neural foramen. (b) Oblique, “Scottie Dog” radiographic projection showing the 22-gauge, 15-cm-long needle (arrowhead) advanced into the L4-L5 intervertebral disc. (c) Lateral radiographic projection showing the 22-gauge, 15-cm-long needle (arrowhead) located in the nucleus pulposus. (d) Cone-beam CT showing ozone gas in the L4-5 disc space (arrow) and the epidural space (arrowhead).

**Results**

A total of 39 patients were treated with oxygen-ozone therapy. Of these, 33 patients (84.6%) underwent only 1 oxygen-ozone treatment, while 6 patients (15.4%) required a second treatment due to pain recurrence after initial relief. Appropriate gas distribution within the target disc was confirmed postoperatively in 38 of 39 (97%) initial treatments and 6 of 6 (100%) second treatments. There were no complications of treatment at any timepoint. Despite every effort being made to contact all patients who failed to attend follow-up appointments (including at least 3 documented attempts by letter, phone, or email), the dropout rate was greater than expected. Six patients (15.4%) were lost to follow-up by 6 months after treatment, while a total of 11 patients (28.2%) were lost by 12 months after treatment.

*Primary Analyses: Pain Relief and Functional Improvement*

Overall, 91% (32/35) of per-protocol patients (those who completed follow-up and did not have significant protocol deviations) showed detectable improvement in ODI at 1 month. This increased to 93% (26/28) of per-protocol patients at 1-year follow-up. At 1 month after treatment, 35 patients were included for analysis due to patient noncompliance with protocol and dropout (including 6 patients who received a second oxygen-ozone treatment). Excluding dropouts, 60% (21/35) of patients showed significant ( $\geq 13$  points) improvement

in ODI scores, which decreased from a mean of  $5.7 \pm 11.3$  at baseline to  $31.4 \pm 18.2$  ( $P = .01$ ).

VAS scores for leg pain decreased from a mean of  $61.8 \pm 15.8$  at baseline to  $35.5 \pm 23.8$  ( $P = .05$ ), with 54% (19/35) of patients showing significant ( $\geq 20$ -mm) improvement. By comparison, back pain VAS scores decreased from a mean of  $6.8 \pm 2.2$  at baseline to  $35.1 \pm 21.7$  ( $P = .12$ ), with 49% (17/35) of patients evincing significant ( $\geq 20$  mm) improvement.

At 6 months after treatment, 33 patients were included for analysis (including 5 patients who received a second oxygen-ozone treatment). Here, 67% (22/33) of patients showed significant improvement in ODI scores, which decreased from a mean of  $5.5 \pm 11.4$  at baseline to  $3.1 \pm 21.6$  ( $P = .02$ ).

Leg pain VAS scores decreased from a mean of  $62.0 \pm 16.2$  at baseline to  $3.6 \pm 26.0$  ( $P = .01$ ), with 64% (21/33) of patients significantly improving from baseline. Back pain VAS decreased from a mean of  $6.3 \pm 2.7$  at baseline to  $34.3 \pm 27.7$  ( $P = .12$ ), with 52% (17/33) of patients showing significant improvement.

Similar results were observed at 12 months after treatment. At this timepoint, 28 patients were included for analysis (5 of whom received a second oxygen-ozone treatment). ODI scores were significantly improved in 68% (19/28) of patients, decreasing from a mean of  $48.9 \pm 1.6$  at baseline to  $23.3 \pm 17.8$  ( $P < .01$ ). Leg pain VAS scores decreased from a mean of  $62.3 \pm 16.0$  at baseline to  $27.2 \pm 27.4$  ( $P < .01$ ) and were significantly improved in 64% (18/28) of patients. Back pain VAS scores decreased from a mean of  $6.5 \pm 21.5$  at baseline to  $31.3 \pm 28.9$

**Table 4** Analysis Summary of Analgesic Medication Use

			Number of Patients Reporting at Follow-up	Proportion of patients taking analgesic medication pretreatment (%)	Proportion of patients taking analgesic medication at follow-up (%)	Probability that the proportion of patients taking analgesic medication at follow-up is the same as at pretreatment.
1-Month Follow-up	1 <sup>st</sup> Treatment Only	Primary	38	92	58	<.0001
		Secondary	35	91	54	<.0001
	1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> Treatments Combined	Primary	34	92	41	<.0001
		Secondary	32	91	41	<.0001
6-Month Follow-up	1 <sup>st</sup> Treatment Only	Primary	29	97	41	<.0001
		Secondary	27	96	41	<.0001
	1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> Treatments Combined	Primary	34	92	41	<.0001
		Secondary	32	91	41	<.0001
1-Year Follow-up	1 <sup>st</sup> Treatment Only	Primary	25	97	40	<.0001
		Secondary	23	95	39	<.0001
	1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> Treatments Combined	Primary	30	92	40	<.0001
		Secondary	28	89	39	<.0001

( $P = .09$ ), with 61% (17/28) of patients showing significant improvement (Table 4).

### *Secondary Analyses*

At baseline, 92% (35/38) of patients reported taking analgesic medications (1 patient did not report medication use). This proportion was significantly decreased at each follow-up timepoint; at 1 month this had dropped to 54% (19/35) ( $P < .01$ ), at 6 months to 41% (13/32) ( $P < .01$ ), and at 12 months to 39% (11/28) ( $P < .01$ ) (Table 3). Of the 6 patients who received a second treatment, 5 (83%) subsequently improved on all pain and function metrics. Duration of pain prior to treatment was found to significantly correlate with ODI improvement at both 6 months ( $P = .02$ ) and 1 year ( $P = .04$ ) and with leg VAS improvement at 1 year ( $P = .03$ ). In each case, the correlation was negative (ie, the longer the duration of pain prior to treatment, the smaller the improvement). Comparisons between patients who did and did not receive corticosteroid and local anesthetic injections and between patients who did and did not receive conscious sedation yielded no significant differences.

### **Discussion**

Based on a lack of treatment-related adverse events, these results demonstrate that oxygen-ozone therapy is a safe treatment for patients with contained herniated lumbar discs. They also suggest that oxygen-ozone therapy is effective at improving pain and function. At 1 month after treatment, 60% of patients showed significant individual improvement in terms of general pain and function, and approximately 50% showed significant improvement on regional measures of back and leg pain. Average general pain and function and regional leg pain scores also exceeded the sensitivity of their respective scales, indicating that score improvements reflected perceptible differences for patients. These results were maintained at 6-months and 12-months follow-up. Oxygen-ozone therapy also proved effective at reducing pain and improving function in the small subset of patients who required a second treatment. Notably, mean pain and function outcomes did not differ significantly from those reported in a previously published Italian clinical trial, indicating study equivalence<sup>23</sup>.

Interestingly, regional leg pain typically subsided more quickly and substantially than regional back pain; despite widespread improvements in regional back pain, the mean improvement from baseline never exceeded the minimum clinically important

difference. This is consistent with the general trend of leg pain resolving before back pain and likely reflects the rapid resolution of mass effect on the adjacent nerve root (leading to prompt improvement of radicular leg pain) compared to the longer time required for the disc space to heal overall<sup>34</sup>.

Oxygen-ozone treatment also reduced the use of analgesic medication, which is a noteworthy finding given the inconvenience, side effects, and risks of chronic pharmacological pain management. Importantly, some patients who did not report statistically significant improvements in pain and function were nonetheless able to stop taking medication to manage their pain. Indeed, it is conceivable that some of these patients did in fact experience pain relief as a result of treatment—thus permitting them to discontinue their analgesic medications—but underreported this improvement due to post-treatment expectations or other factors. That longer durations of pain prior to treatment were associated with smaller magnitudes of improvement after oxygen-ozone treatment reinforces the importance of timely treatment for this condition.

There were several limitations to this study. First, it constituted an open-label pilot trial with a reasonably small sample size; as such, its results warrant more rigorous and expansive follow-up in the form of a randomized controlled clinical trial. Additionally, it should be acknowledged that minor changes to the protocol (ie, the addition of juxta-annular methylprednisolone and bupivacaine injections and introduction of conscious sedation) were implemented mid-study to minimize transient periprocedural discomfort that had been noted by the initial patients. Although conscious sedation and methylprednisolone/bupivacaine injection did improve patients' periprocedural comfort, they did not appear to confer any significant long-term benefit. This contrasts with prior indications that oxygen-ozone therapy combined with methylprednisolone/bupivacaine is superior to oxygen-ozone therapy alone<sup>21</sup> and might simply reflect the small number of patients who did not receive methylprednisolone/bupivacaine in this study. Nonetheless, it is in keeping with randomized prospective European studies that observed that oxygen-ozone therapy is superior to methylprednisolone/bupivacaine alone<sup>35</sup>. Finally, the physicians involved in this study faced a technical learning curve that may also have contributed to outcome heterogeneity. For instance, they came to recognize subtle clues, such as the lateral deflection of the needle by the annulus fibrosis, that helped to optimize needle placement, and learned to deliver injections more ipsilaterally with respect to the herniation to achieve better results.

In summary, the current study constitutes the first North American multicenter clinical trial of oxygen-ozone treatment for contained herniated discs. At 1-year follow-up, no adverse events had occurred, and the cohort as a whole experienced significant improvements in pain and function as well as significantly decreased use of analgesic medication. Over 90% of patients experienced detectable improvement in general pain and function 1 month after treatment, and this proportion was sustained at 1-year-follow-up. Notably, regional leg pain

typically subsided more quickly and substantially than regional back pain. These results provide further indication that oxygen-ozone treatment is a safe therapy for contained herniated discs and strengthen the clinical justification for its use in North America.

#### **Acknowledgments**

This study was funded by ActiveO, LLC (Salt Lake City, Utah), the makers of the Ozone device.

## References

- 1 Moore KL, Agur AMR, Dalley AF. *Essential Clinical Anatomy*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015.
- 2 Andreula CF, Simonetti L, De Santis F, et al. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003; 24: 996-1000.
- 3 Marshall LL, Trethewie ER. Chemical irritation of nerve-root in disc pro-lapse. *Lancet Lond Engl*. 1973; 2: 320.
- 4 Simonetti L, Agati R, Cenni P, et al. Mechanism of pain in disc disease. *Neuroradiol J*. 2001; 14: 171-174.
- 5 Valat JP, Genevay S, Marty M, et al. Sciatica. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010; 24: 241-252.
- 6 Rhee JM, Schaufele M, Abdu WA. Radiculopathy and the herniated lumbar disc. Controversies regarding pathophysiology and management. *J Bone Joint Surg Am*. 2006; 88: 2070-2080.
- 7 Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract Off J World Inst Pain*. 2008; 8: 18-44.
- 8 Mixter WJ, Barr JS. Rupture of the intervertebral disc with involvement of the spinal canal. *N Engl J Med*. 1934; 211: 210-215.
- 9 Crock HV. Observations on the management of failed spinal operations. *J Bone Joint Surg Br*. 1976; 58: 193-199.
- 10 Greenwood J, McGuire TH, Kimbell F. A study of the causes of failure in the herniated intervertebral disc operation: an analysis of sixty-seven reoperated cases. *J Neurosurg*. 1952; 9: 15-20.
- 11 Onik G, Helms CA, Ginsberg L, et al. Percutaneous lumbar discectomy using a new aspiration probe: porcine and cadaver model. *Radiology*. 1985; 155: 251-252.
- 12 Choy DS, Hellinger J, Tassi GP, et al. Percutaneous laser disc decompression. *Photomed Laser Surg* 2007; 25: 60.
- 13 Alexandre A, Coro' L, Azuelos A, et al. Percutaneous nucleoplasty for discoradicular conflict. *Acta Neurochir Suppl*. 2005; 92: 83-86.
- 14 Pauza KJ, Howell S, Dreyfuss P, et al. A randomized, placebo-controlled trial of intradiscal electrothermal therapy for the treatment of discogenic low back pain. *Spine J Off J North Am Spine Soc*. 2004; 4: 27-35.
- 15 Javid MJ. Chemonucleolysis versus laminectomy. A cohort comparison of effectiveness and charges. *Spine*. 1995; 20: 2016-2022.
- 16 Nelemans PJ, deBie RA, deVet HC, et al. Injection therapy for subacute and chronic benign low back pain. *Spine*. 2001; 26: 501-515.
- 17 D'Erme M, Scarchilli A, Artale AM, et al. [Ozone therapy in lumbar sciatic pain]. *Radiol Med (Torino)*. 1998; 95: 21-24.
- 18 Giurazza F, Guarnieri G, Murphy KJ, et al. Intradiscal O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>: rationale, injection technique, short- and long-term outcomes for the treatment of low back pain due to disc herniation. *Can Assoc Radiol J*. 2017; 68: 171-177.
- 19 Pellicano G, Martinelli F, Tavanti V, et al. The Italian Oxygen-Ozone Therapy Federation (FIO) study on oxygen-ozone treatment of herniated disc. *Int J Ozone Ther*. 2007; 6: 7-15.
- 20 Bonetti M, Fontana A, Cotticelli B, et al. Intraforaminal O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> versus periradicular steroidal infiltrations in lower back pain: randomized controlled study. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005; 26: 996-1000.
- 21 Muto M, Andreula C, Leonardi M. Treatment of herniated lumbar disc by intradiscal and intraforaminal oxygen-ozone (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>) injection. *J Neuroradiol*. 2004; 31: 183-189.
- 22 Buric J, Rigobello L, Hooper D. Five and ten year follow-up on intradiscal ozone injection for disc herniation. *Int J Spine Surg*. 2014; 8.
- 23 Murphy K, Muto M, Steppan J, et al. Treatment of contained herniated lumbar discs with ozone and corticosteroid: a pilot clinical study. *Can Assoc Radiol J*. 2015; 66: 377-384.
- 24 Steppan J, Meaders T, Muto M, et al. A metaanalysis of the effectiveness and safety of ozone treatments for herniated lumbar discs. *J Vasc Interv Radiol*. 2010; 21: 534-548.
- 25 Magalhaes FNDO, Dotta L, Sasse A, et al. Ozone therapy as a treatment for low back pain secondary to herniated disc: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pain Physician*. 2012; 15: E115-E129.
- 26 Iliakis E, Valadakis V, Vynios DH, et al. Rationalization of the activity of medical ozone on intervertebral disc a histological and biochemical study. *Riv Neuroradiol*. 2001; 14: 23-30.
- 27 Murphy K, Elias G, Steppan J, et al. Percutaneous treatment of herniated lumbar discs with ozone: investigation of the mechanisms of action. *J Vasc Interv Radiol*. 2016; 27: 1242-1250.e3.
- 28 Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, et al. Studies on the biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines. *Lymphokine Cytokine Res*. 1993; 12: 121-126.
- 29 Rahimi-Movaghar V, Eslami V. The major efficient mechanisms of ozone therapy are obtained in intradiscal procedures. *Pain Physician*. 2012; 15: E1007-E1008.
- 30 Fairbank JC, Couper J, Davies JB, et al. The Oswestry low back pain disability questionnaire. *Physiotherapy*. 1980; 66: 271-273.
- 31 Wong DL, Baker CM. Pain in children: comparison of assessment scales. *Pediatr Nurs*. 1988; 14: 9-17.
- 32 Fritz JM, Irrgang JJ. A comparison of a modified Oswestry Low Back Pain Disability Questionnaire and the Quebec Back Pain Disability Scale. *Phys Ther*. 2001; 81: 776-788.
- 33 Hägg O, Fritzell P, Nordwall A, Swedish Lumbar Spine Study Group. The clinical importance of changes in outcome scores after treatment for chronic low back pain. *Eur Spine J*. 2003; 12: 12-20.
- 34 Koes BW, van Tulder MW, Peul WC. Diagnosis and treatment of sciatica. *BMJ*. 2007; 334: 1313-1317.
- 35 Perri M, Marsecano C, Varrassi M, et al. Indications and efficacy of O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> intradiscal versus steroid intraforaminal injection in different types of disco vertebral pathologies: a prospective randomized double-blind trial with 517 patients. *Radiol Med (Torino)*. 2016; 121: 463-471.

Kieran Murphy, MD, FRCPC, FSIR  
 Joint Department of Medical Imaging  
 University Health Network, University of Toronto  
 399 Bathurst Street  
 Toronto, Ontario, Canada M5T 2S8  
 E-mail: kieran.murphy@uhn.ca



NUOVA  
FEDERAZIONE ITALIANA  
DI OSSIGENO-OZONO

Società scientifica riconosciuta dal Ministero della Salute  
ai sensi della L. 8 marzo 2017, n. 24

# CONSENSUS CONFERENCE 2019

Revisione delle Linee Guida e delle Buone Pratiche cliniche in Ozonoterapia

Roma  
5 Ottobre 2019

Hotel NH Roma  
Leonardo da Vinci  
Via dei Gracchi, 324 ■ 00142 Roma

Per informazioni: [formazione@xray-service.it](mailto:formazione@xray-service.it)  
[www.xray-service.it](http://www.xray-service.it) (+39) 030 3701212  
[www.nuovafio.it](http://www.nuovafio.it) (+39) 3388053688  
Provider: X-RAY SERVICE S.r.l.

---

## Temi aperti in Ozonoterapia

---

### **"FOCUS ON" 2019: Urologia e Ginecologia**

- 9.00 Moderatori: P. Tordiglione (Roma)  
M. Bonetti (Brescia)
- Discussant: M. Cervigni (Roma)  
P. Bisetti (Paderno Dugnano - MI)  
M. Bonito (Roma)
- 

## Stato dell'Arte in Tema di Ozonoterapia

---

- Moderatori: M. Muto (Napoli)  
G. Tabaracci (Brescia)
- 10,30 V. Travagli (Siena)  
*Il "prodotto" Ozono e le tematiche relative alla qualità*
- 10,50 M. Bonetti (Brescia)  
*Sviluppo dell'Ozonoterapia in Italia. Stato attuale e prospettive future*
- 11,10 N. Dardes (Roma)  
*Il concetto di appropriatezza delle cure nel Sistema Sanitario Nazionale Italiano. Il significato della certificazione del medico e del centro clinico.*
- 11.30 M. Maggiorotti (Roma)  
*Evoluzione del pensiero e della prassi in ambito Medico Legale: la legge Gelli ed i suoi decreti attuativi.*
- 12.00 Domande ai relatori
- 

## 12.30 NUOVA FIO: Assemblea dei Soci

---

- Relazione del Presidente  
Relazione del Segretario Generale  
Approvazione del bilancio  
Varie ed eventuali
- 13.30 VISITA GUIDATA AL SITO ARCHEOLOGICO
- 

## 15.30 Consensus Conference 2019

---

### **Revisione delle Linee Guida e delle Buone Pratiche cliniche in Ozonoterapia**

- Moderatori: M. Maggiorotti (Roma)  
N. Dardes (Roma)
- Panel: M. Bonetti (Brescia)  
M. Fioranelli (Roma)  
M. Martinelli (Roma)  
M. Muto (Napoli)  
M. Rascaroli (Bergamo)  
R. Saggini (Chieti)  
G. Tabaracci (Brescia)  
P. Tordiglione (Roma)
- 
- 18.00 *Chiusura dei lavori*
-



# — NUOVA — **FEDERAZIONE ITALIANA DI OSSIGENO-OZONO**

Società scientifica riconosciuta dal Ministero della Salute  
ai sensi della L. 8 marzo 2017, n. 24

<https://www.nuovafio.it/>

## COMITATO DIRETTIVO

### **MATTEO BONETTI**

**PRESIDENTE**, Specializzazione: Neuroradiologia

### **MAURO MARTINELLI**

**VICE PRESIDENTE**, Specializzazione: Nefrologia - Medicina interna

### **MAURIZIO MAGGIOROTTI**

**SEGRETARIO GENERALE**, Specializzazione: Ortopedia e Traumatologia

### **GABRIELE TABARACCI**

**CONSIGLIERE E PAST PRESIDENT**, Specializzazione: Ortopedia e Traumatologia

### **NICOLA DARDES**

**CONSIGLIERE COMITATO SCIENTIFICO**, Specializzazione: Tisiologia e malattie dell'apparato respiratorio

## COMITATO SCIENTIFICO

### **JOSÉ BAEZA NOCI**

Professore Dipartimento di Anatomia ed Embriologia Umana  
Facoltà di Medicina e Odontoiatria  
Università di Valencia (Spagna)

### **GIANFRANCO BOTTA**

Specialista in Farmacologia Clinica  
Roma

### **NICOLA DARDES**

Primario Pneumologo  
Docente Master Medicina Integrata  
Università "G. Marconi", Roma

### **MASSIMO FIORANELLI**

Professore Associato di Fisiologia  
Università "G. Marconi" - Roma

segue Comitato Scientifico ►

### **MANUELA MALATESTA**

Professore Associato di Anatomia Umana  
Dipartimento di Neuroscienze, Biomedicina e Movimento  
Sezione di Anatomia e Istologia  
Università di Verona

### **MARIO MUTO**

Direttore dell'Unità di Neuroradiologia Diagnostica e Interventistica  
Ospedale Cardarelli (Napoli)

### **PAOLO TORDIGLIONE**

Anestesista e Rianimatore, specialista in Terapia Antalgica  
Dottore di Ricerca in Neuroscienze, Ozonoterapeuta - Medicina Molecolare

### **VALTER TRAVAGLI**

Professore Associato di Tecnica Farmaceutica, Galenica e Neogalenica  
Direttore della Scuola di Specializzazione in Farmacia Ospedaliera  
Dipartimento di Biotecnologie, Chimica e Farmacia  
Università degli Studi di Siena



## SEDI REGIONALI

<https://www.nuovafio.it/sedi-periferiche/>



PIEMONTE	DEL BARBA DAMIANO
LIGURIA	ARMANDO SIRITO
LOMBARDIA	FILIPPO ALBERTINI
VENETO	FEDI LUDOVICA
FRIULI-VENEZIA GIULIA	AMATO DE MONTE
EMILIA ROMAGNA	CIRILLO LUIGI
TOSCANA	PELLICANO' GIANNATONIO
MARCHE	TRICARICO GERARDO
LAZIO	FEDERICO BERNI
UMBRIA	GIORGIO TAZZA
CAMPANIA	DIANO ALVARO
PUGLIA	DE MICHELE CARLO
CALABRIA	CHIARAVALLOTTI CORRADO
SICILIA	GUERRERA SANTINO



# — NUOVA — FEDERAZIONE ITALIANA DI OSSIGENO-OZONO

Società scientifica riconosciuta dal Ministero della Salute  
ai sensi della L. 8 marzo 2017, n. 24

<https://www.nuovafio.it/>

Atto Nuova FIO 21 novembre 2017

## REQUISITI PER L'UTILIZZO DELL'OSSIGENO OZONO TERAPIA

La Nuova FIO (Federazione Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia), impegnata nella tutela e nella buona pratica della Ossigeno-Ozonoterapia e della sua caratterizzazione scientifica, sollecitata dagli ozonoterapeuti del Paese circa

### **i requisiti necessari per la pratica di tale terapia**

notato che su alcuni siti web è stato allarmisticamente e ingannevolmente affermato che la terapia con ozono può essere svolta esclusivamente dai medici che utilizzano un particolare tipo di generatore per ozono e solo da chi ha frequentato corsi dagli stessi patrocinati

DICHIARA ai sensi di Legge

1. che l'Ossigeno-Ozonoterapia è una "terapia medica" e come tale può essere praticata esclusivamente da personale medico ed eseguita con rigore scientifico come per qualsiasi altra terapia;
2. che il Medico che pratica la terapia con ozono lo fa sotto la propria ed esclusiva responsabilità, come per qualsiasi altra terapia;
3. che l'Ossigeno-Ozonoterapia come ogni altra terapia medica (ad eccezione dell'anestesiologia, della radiologia) non è sottoposta né vincolata ad alcuna Specializzazione Medica specifica;
4. che il Medico che opera nell'Unione Europea, per generare ed applicare l'ozono, deve utilizzare apparecchiature appropriate cioè in possesso del marchio CE, come per qualsiasi altra terapia;
5. che è consigliabile -ma non obbligatorio- seguire, nell'iter formativo professionale specifico, un Corso universitario di Perfezionamento in Ossigeno Ozonoterapia Medica, un Master o altro Corso accreditato scegliendolo tra le varie offerte ma rifuggendo da chi ha interessi commerciali, come per qualsiasi altra terapia.

Il Consiglio Direttivo della Nuova Fio

### Segreteria Nazionale

Via Giovanni Antonelli, 47 - 00197 ROMA

C.F.: 98109470173

Cell. 338 8053688 - Tel. 06 808 2454 - Fax 06 8072351

[www.nuovafio.it](http://www.nuovafio.it) - [segreteria@nuovafio.it](mailto:segreteria@nuovafio.it)



# REGISTRO DI SORVEGLIANZA PER LA SICUREZZA IN OZONOTERAPIA

Home / REGISTRO DI SORVEGLIANZA PER LA SICUREZZA IN OZONOTERAPIA

<http://progettozono.it/index.php/registro-di-sorveglianza/>

L'ozonoterapia, nonostante l'ampia letteratura scientifica raccolta negli ultimi decenni che ne dimostra gli innumerevoli effetti terapeutici, è purtroppo ancora relegata tra le **terapie complementari e non convenzionali**, ed i medici che la praticano vengono ancora considerati dei professionisti "fantasiosi e sopra le righe" in particolare dal mondo scientifico-universitario.

L'ozonoterapia, utilizzata da oltre un secolo da migliaia di pazienti in tutto il mondo, viene poi considerata non solo "inutile ed alternativa" ma anche pericolosa in quanto **correlata ad ipotetici e fantasiosi gravi effetti collaterali**. Tutto questo accade sia per la totale "ignoranza" della classe medica su questa terapia ma anche perché non sono presenti ampi studi scientifici nella letteratura internazionale che ne dimostrino la sicurezza e l'assenza di effetti collaterali.

Chi pratica l'ozonoterapia può solo affermarne la sicurezza in base alla propria personale esperienza, ma non può portare dati presenti nella letteratura scientifica a supporto della propria opinione. Inoltre, contrariamente a quanto accade per ogni terapia "tradizionale", **manca un sistema di farmacovigilanza per l'ozonoterapia**.

Dal momento che nessun ente pubblico o privato ha interesse a farla, la **farmacovigilanza sull'ozonoterapia deve partire dal mondo stesso dell'ozono**, non solo per dimostrarne la sicurezza ma anche per dare prova di scientificità a quanti ci accusano di empirismo.

Con questa missione nasce questo progetto che vuole coinvolgere su scala nazionale il **maggior numero possibile di medici che praticano l'ozonoterapia sotto qualsiasi forma** e che ha come scopo la registrazione dei pazienti sottoposti alla terapia e la registrazione degli eventuali eventi avversi.

La partecipazione a questo progetto è assolutamente volontaria e comporta solo **l'iscrizione annuale all'associazione progettozono** (<http://progettozono.it/index.php/partecipa-a-progettozono/>).

Confido nell'iscrizione del maggior numero possibile di ozonoterapeuti che vogliano dedicare alcuni minuti del loro tempo per contribuire alla sicurezza ed alla validazione di questa "nostra terapia".

Buon lavoro a tutti noi!

*Dott. Mauro Martinelli*  
(Membro Consiglio Direttivo FIO)

Per partecipare al registro di sorveglianza scrivici a [info@progettozono.it](mailto:info@progettozono.it)



# — NUOVA — FEDERAZIONE ITALIANA DI OSSIGENO-OZONO

Società scientifica riconosciuta dal Ministero della Salute  
ai sensi della L. 8 marzo 2017, n. 24

<https://www.nuovafio.it/>

Cari colleghi,

la nascita della Nuova FIO è legata non solo alla necessità di adeguarsi alle normative della legge Gelli ma anche alla esigenza di innalzare il livello di credibilità e scientificità dell'Ozonoterapia cercando di uscire dal “si dice, mi sembra che, è così perché io ho notato che” per arrivare ad una solida validazione scientifica.

In quest'ambito uno dei punti cardine che dobbiamo assolutamente affrontare è il problema della sicurezza in ozonoterapia.

Tutti noi che giornalmente effettuiamo trattamenti con ossigeno ozono sappiamo per esperienza pratica che è una metodica sicura e con rarissimi e transitori effetti collaterali. Il problema è che se questo dato viene riportato come opinione od esperienza personale il suo valore sia scientifico che eventualmente giuridico è praticamente pari a zero.

Appena fondata la Nuova FIO ha sentito la necessità di attivarsi nella direzione di classificare e censire quanti più dati possibili sulla reale numero di trattamenti con Ozonoterapia che vengono attualmente effettuati in Italia e quanto sia la reale e documentata incidenza di questi “terribili paventati effetti collaterali”.

Per questo motivo ha immediatamente abbracciato e sponsorizzato l'idea dell'associazione *Progettozono* di creare il primo registro di sorveglianza per la sicurezza in ozonoterapia. Con una massiva adesione di medici che praticano l'Ozonoterapia, saremo in grado nel giro di pochi mesi di avere una fotografia sufficientemente attendibile di quanti trattamenti vengono effettuati giornalmente in Italia e soprattutto, dal riscontro di eventuali effetti collaterali, dimostrare dati alla mano la sicurezza di questa terapia.

Il registro è gestito dalla associazione Progettozono in quanto deve essere aperto anche a medici non FIO, ma l'adesione e la sponsorizzazione della Nuova FIO è completa ed assoluta dal momento che la dimostrazione statistica che l'ozonoterapia è una terapia sicura e non pericolosa è la partenza di qualsiasi successiva validazione scientifica di efficacia (*primum non nocere*).

Ci auguriamo di avere una ampia adesione e collaborazione dei nostri iscritti dal momento che i medici che praticano quotidianamente la terapia dovrebbero essere i più interessati a lavorare in sicurezza, sia pratica che scientifica.

Non esitate a contattarmi/ci per qualsiasi chiarimento o suggerimento in merito; noi vorremmo che la Nuova FIO sia una federazione attiva, democratica ed aperta ai suoi associati e non la solita associazione mummificata su pochi personaggi distanti dalla realtà.

Auguri a tutti di buon lavoro e buon anno.

*Mauro Martinelli*



**NUOVA**  
**FEDERAZIONE ITALIANA**  
**DI OSSIGENO-OZONO**

Società scientifica riconosciuta dal Ministero della Salute  
ai sensi della L. 8 marzo 2017, n. 24

<https://www.nuovafio.it/>

Al Presidente della Nuova FIO

Il sottoscritto/a .....

Codice Fiscale .....

Residente in Via .....

CAP ..... Città .....

e-mail ..... Telefono .....

Mobile .....

Iscritto Ordine dei Medici di .....

Numero .....

*Chiede di essere iscritto alla:*

**Nuova Federazione Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia**

Allega un breve curriculum vitae (una pagina)

Data ..... Firma .....

Mi impegno al versamento della quota sociale annua di 100,00 €, come iscrizione alla Nuova FIO

Dr Maurizio Maggiorotti - Segretario Nuova FIO

Sede: Via G. Antonelli, 47 - 00197 Roma

Tel.: (+39) 338 8053688 - 06 8082454 - e-mail: [segreteria@Nuova FIO.it](mailto:segreteria@Nuova FIO.it) - [www.nuovafio.it](http://www.nuovafio.it)

con bonifico presso: UNICREDIT • Iban: IT32V0200805120000105059850

Comunicazione all'Abbonato - In relazione a quanto disposto dall'art. 10 della L. n. 675/1996, Le assicuriamo che i Suoi dati (nome, cognome, titolo di studio, attività svolta e indirizzo), presenti nel nostro archivio informatico, verranno utilizzati esclusivamente per l'invio di lettere commerciali e avvisi promozionali inerenti al rapporto editore-abbonato. Ai sensi dell'art. 13 della L. n. 675/1996, Lei potrà opporsi all'utilizzo dei dati in nostro possesso se trattati in maniera difforme a quanto disposto dalla legge

Nuova FIO • Via G. Antonelli, 47 - 00197 Roma • C.F.: 98109470173 • Tel. (+39) 338 8053688 - 06 8082454

