UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA

MASTER DI II° LIVELLO

IN OSSIGENO-OZONO TERAPIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA INTERNA E TERAPIA MEDICA

COORDINATORE Prof. Giovanni Ricevuti

L'Ossigeno Ozono terapia nel trattamento delle patologie del microcircolo e nella neuroprotezione.

Valutazione sperimentale del miglioramento del flusso e della ossigenazione cerebrale valutati mediante doppler trans-cranico e Spettroscopia NIRS in pazienti trattati con GAE

RELATORE

Prof. Marianno Franzini

CANDIDATO

Dr. Sergio Pandolfi

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Indice:

Ringraziamenti pag. 3

Introduzione pag. 4

L'Ossigeno-Ozonoterapia pag. 6

Meccanismi d'azione dell'ozono pag. 8

Circolazione cerebrale e autoregolazione pag. 20

Discussione: Azioni terapeutiche dell'ossigeno-ozono sul microcircolo pag. 25

Materiali e metodi pag. 38

Conclusioni pag. 56

Applicazione dell'ozonoterapia nella prevenzione del vasospasmo cerebrale. pag. 59

Bibliografia pag. 70

A mia moglie Anna , l'amore della mia vita.

A tutte le persone che ci hanno voluto bene.

Introduzione:

L'ossigeno-ozonoterapia viene sempre più conosciuta da un numero crescente di pazienti e si sta affermando come potente strumento terapeutico a disposizione del medico per i risultati clinici sempre più numerosi ed evidenti, sia nelle affezioni vascolari e del microcircolo [15,28,35,36,43,45,46,47,60,63,64] che nella terapia del dolore dell'apparato osteo-articolare [2,18,29,,48,56,62,63].

L'ozono è una forma allotropica dell'ossigeno; nell'atmosfera assorbe la maggior parte delle radiazioni ultraviolette emanate dal sole .

L'ossigeno-ozonoterapia è una macroterapia che riattiva il microcircolo con migliore ossigenazione nei vari distretti corporei , ha un'azione protettiva multi-organo [2,3,4,5,7,8,9,10,11,12,13,17,28,31,32,33,35,38,40,42,49,50,52] induce un aumento della deformabilità e della filtrabilità eritrocitaria perché spezza le lunghe catene degli acidi grassi localizzate sulla superficie dei globuli rossi mediante lipoperosidazione controllata [2,8,23,34,35,52,53,54,55,56,57,59,62,64,66,68] e il rilascio di ossido nitrico a livello degli sfinteri pre-capillari [2,11,14,15,17,32,35,38,42,47]

Abbiamo costantemente osservato un evidente miglioramento delle condizioni circolatorie centrali e periferiche, con risultati clinici difficilmente ottenibili con altre terapie. Tale miglioramento si manifesta clinicamente in recupero, più o meno evidente, in rapporto alla gravità e cronicità dello stato patologico raggiunto. Si assiste ad un miglioramento delle facoltà cognitive e mnesiche, coordinazione motoria nelle patologie cerebrovascolari e nella demenza senile [1,6,9,10,27,31,41,56,61] ; miglioramento della funzione renale [8,11,22,32,,49,] e cardiaca [5,28,33,38,57,] nei pazienti affetti da insufficienza renale [13,22,49], cardiopatia ischemica[5,28,33,38,57,] e dell'ipertensione polmonare [3,] ; miglioramento della claudicatio vascolare [15,35,43,45,45,49,,60] e scomparsa del dolore ischemico notturno agli arti inferiori nei pazienti affetti da arteriopatia periferica degli arti inferiori; riduzione delle rughe e miglioramento dell'elasticità cutanea; tendenza ad una normalizzazione dei valori pressori e glicemici, tanto da dover ridurre spesso il carico farmacologico nei pazienti diabetici [7,21,39,47,66] : riduzione della spasticità anche nelle vesciche neurologiche, su base degenerativa , post-infiammatoria, post traumatica celebrale; recupero delle funzioni articolari nell'artrosi, anche avanzata, nonchè evidente risoluzione delle tendiniti e flogosi muscolari[17,48,56,59,63].

In nessun caso si riscontra aggravamento delle patologie di base, nè effetti collaterali degni di nota , tranne qualche reazione vagale dovuta all'effetto dell'ago o alla vista del sangue.

Le uniche controindicazioni all'ozonoterapia,sono il favismo ed l'ipertiroidismo, se ci si attiene ai protocolli suggeriti dalla. S.I.O.O.T. (Società Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia).

Una delle cause fondamentali dell'invecchiamento è il decadimento delle funzioni enzimatiche deputate alla produzione di energia a livello mitocondriale e la ridotta eliminazione dei catabolidi cellulari, con conseguente loro accumulo tissutale, a causa della disfunzione del microcircolo con rallentamento della circolazione ematica e linfatica . Iniettando O2-O3 nel sottocute edematoso, notiamo un'immediata riduzione dell'edema dovuta all'intensa attività linfodrenante e di miglioramento dell'attività del microcircolo. L'ozono ha una azione anti infiammatoria [3,14,16,20,22,24,25,26,30,44,48,62,65,], determina una riduzione della produzione delle prostaglandine agendo sull'acido arachidonico e ha una azione antiossidante [17,26,34,40,42,50,53,54,55,57,67] attivando le funzioni enzimatiche protettive endogene delle cellule contro i radicali liberi .

Presentiamo i primi dati su 18 pazienti di uno studio sperimentale che si pone l'obiettivo di indagare le modificazioni che avvengono nella circolazione cerebrale di pazienti, patologici e non, a seguito di grande auto-emoinfusione con sangue ozonizzato [1,6].

I pazienti sono stati monitorizzati in condizioni basali, durante la terapia e per i successivi 90 minuti in modo continuo. Il monitoraggio è avvenuto con due strumenti: uno spettroscopio NIRS (strumento completamente non invasivo, con cui si sono registrate le variazioni di concentrazione dei principali cromofori presenti nel microcircolo cerebrale) e un TCD (TransCranial Doppler, utilizzato per misurare il flusso sanguigno nell'arteria cerebrale media). Un successivo monitoraggio di circa 30 minuti è stato effettuato a 24h dalla terapia.

Dagli studi preliminari si evidenzia un aumento dell'emoglobina ossigenata a carico dei lobi cerebrali ed un aumento di flusso a livello dell'arteria cerebrale media a distanza di un'ora dalla reinfusione e tale incremento di flusso a livello dell'arteria carebrale media è risultato persistere dopo 24 ore. Si propone altresì l'applicazione dell'ossigeno-ozonoterapia nella prevenzione del vasospasmo cerebrale.

L'ossigeno-ozonoterapia

L'ozono è una molecola composta da tre atomi di ossigeno (O3). È un gas instabile (gassoso, a 20°C ha un tempo di dimezzamento di 40 minuti, in soluzione acquosa di 20 minuti), ed allo stato liquido è esplosivo. Non può dunque essere conservato, e deve essere prodotto al momento dell'uso. Ha un odore pungente caratteristico ed è fortemente irritante per le mucose respiratorie. È un energico ossidante e per gli esseri viventi, se respirato, è un gas altamente tossico. È tuttavia un elemento essenziale alla vita sulla Terra per via della sua capacità di assorbire la luce ultravioletta; lo strato di ozono presente nella stratosfera protegge la Terra dall'azione nociva dei raggi ultravioletti UV-C provenienti dal Sole. Dato il suo potere ossidante, l'ozono viene impiegato per sbiancare e disinfettare, in maniera analoga al cloro. Tra gli usi industriali dell'ozono si annoverano soprattutto la disinfezione dell'acqua negli acquedotti, nelle piscine o per l'imbottigliamento. Altri utilizzi riguardano la disinfezione di superfici destinate al contatto con gli alimenti, la disinfezione dell'aria da spore di muffe e lieviti, la disinfezione di frutta e verdura da spore di muffe e lieviti e molti altri .

L'ozono è naturalmente presente anche all'interno di tutti gli esseri viventi, prodotto dai globuli bianchi neutrofili [78] , ed esplica diverse funzioni fondamentali per la vita.

L'utilizzo in campo curativo risale alla prima guerra mondiale, quando venne usato come antibiotico. In occasione della seconda guerra mondiale, casualmente, si osservò che un'atmosfera ricca di ozono favoriva la guarigione delle ferite dei soldati.

Da allora il suo utilizzo nella pratica medica è andato aumentando, ed oggi è una pratica affermata in tutto il mondo. In Germania, ad esempio, è utilizzato dal 40% dei medici, ed è mutuabile.

Il grande vantaggio di trattamenti di questo tipo è che non ci sono controindicazioni, a patto di rispettare i protocolli. Gli unici pazienti che non si possono sottoporre ad ozono terapia sono gli ipertiroidei e quelli affetti da deficit di glucosio-6-fosfatodeidrogenasi (favismo). Non ci sono interferenze con terapie farmacologiche in atto, anzi, la diffusione nell'organismo dei farmaci viene favorita, in quanto il microcircolo viene migliorato. Non può indurre allergia in quanto non è una molecola proteica. D'altra parte, gli effetti benefici sono numerosi, ed interessano l'intero organismo. Come conseguenza di ciò, la richiesta di questo tipo di terapia da parte dei pazienti è in continuo aumento, costringendo tutto il mondo scientifico a focalizzare l'interesse su questa disciplina.

Gli utilizzi in ambito medico sono moltissimi, tra i principali vanno citati:

- come antibiotico, virus-statico (rallenta la replicazione virale) [3,13,16,]
- attivatore del sistema antiossidante ed energetico mitocondriale, [11,17,26,32,39,42,50,54,57]
- antinfiammatorio;[3,13,14,15,20,22,25,26,30,44,48,62,64]
- riattivazione del microcircolo nelle patologie vascolari, aumento della deformabilità dei globuli rossi aumento della cessione di ossigeno ai tessuti [1,6,7,8,8,11,14,15,17,23,28,31,32,34,35,38,36,40,42,45,46,49,50,57,60,61,67,68]
- in ambito ortopedico, nella cura delle ernie discali, artriti ed artrosi;[29,62,63]
- come coadiuvante nella cura dei tumori, nelle patologie neurologiche degenerative ed autoimmuni (demenze, sclerosi multipla...).[18,31,]
- Potenzia gli effetti di radio e chemioterapia, riducendone allo stesso tempo gli effetti collaterali [24,10]
- negli inestetismi cutanei, nei trattamenti contro la cellulite
- nelle patologie del cavo orale.

Parallelamente ai campi di utilizzo, è necessario fare una distinzione in base ai metodi di somministrazione:

- infiltrazioni intraarticolari, come nel caso dell'artrosi del ginocchio, della spalla e dell'anca;
- infiltrazioni sottocutanee, effettuate con un piccolissimo ago. Ad esempio, infiltrando il sottocute delle gambe, si agisce contemporaneamente sulla stasi venosa, sullo schiarimento dei capillari, sul drenaggio linfatico, sullo scioglimento dei grassi, sulla qualità della pelle, sulle smagliature, sullo schiarimento delle chiazze diabetiche e su quelle di emosiderina .
- infiltrazioni paravertebrali, per curare l'artrosi della colonna vertebrale e l'ernia del disco;
- iniezioni locali sottocutanee e intramuscolari, nelle patologie ortopediche o negli inestetismi;
- insufflazioni rettali, nelle patologie intestinali e del microcircolo ;
- autoemoinfusioni, nelle patologie sistemiche vascolari ed autoimmuni;
- acqua ozonizzata, nelle patologie del cavo orale;
- applicazioni locali, per la detersione di ulcere, piaghe da decubito e ferite in generale.

Meccanismi d'azione dell'ozono

L'Ossigeno Ozono Terapia è una macroterapia, è una metodica che viene utilizzata con successo nella cura di patologie diverse, per questo motivo è fondamentale conoscere i meccanismi d'azione che stanno alla base di molteplici attivitá [2] ; anche per cancellare i dubbi, se mai ve ne fossero ancora, riguardanti la sua efficacia e la sua tollerabilità. In relazione a questo parametro, in passato, alcuni criticavano una possibile formazione di forme radicali a seguito della somministrazione di ozono. È bene, a questo punto, fare un po' di chiarezza: l'ozono ricordiamo che reagisce soprattutto con i liquidi biologici, che sono parte costituente dell'organismo, sia come liquidi intracellulari che extracellulari.

Il meccanismo di Griegge [2,59,] di ozono lisi delle sostanze organiche insature, dimostra la formazione di perossidi e gruppi aldeidici. Ma la complessitá delle reazioni biochimiche generate durante l'esposizione del sangue all'ozono coinvolge, nello spazio di microsecondi, un'ampissima gamma di substrati che interagiscono in diverse vie metaboliche.

In pratica l'ozono, che è una molecola instabile e determina reazioni ossidative, se viene somministrato in maniera adeguata, genera uno ''stress ossidativo calcolato e transitorio'' che va a stimolare il sistema antiossidante intracellulare che a sua volta puó intervenire nell'impedire i danni da ossidazione (tipici delle patologie degenerative croniche e patologie infiammatorie).

Un radicale libero è una specie molecolare che, possedendo un solo elettrone nell'orbita periferica è instabile e molto reattiva. L'ozono non è una molecola radicalica in quanto possiede un numero pari di elettroni nell'orbita più esterna. Due radicali possono combinarsi e appaiando i due elettroni, formano una molecola stabile con un legame covalente. Altresì un radicale può donare il suo elettrone a una molecola stabile agendo come una sostanza riducente (donazione di elettroni).

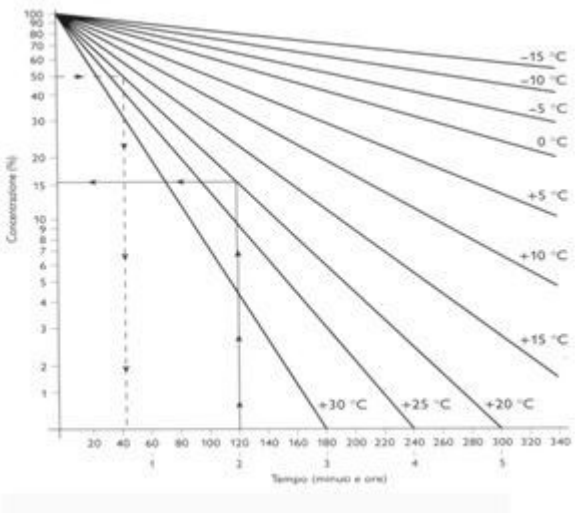
Infine un radicale può catturare un elettrone da una molecola stabile agendo come un ossidante (prelievo di elettroni). Un radicale può integrarsi in una molecola stabile.

L'ozono, pur non essendo una molecola radicalica, è un potente ossidante, molto instabile, che reagisce istantaneamente con altre molecole in soluzione acquosa.

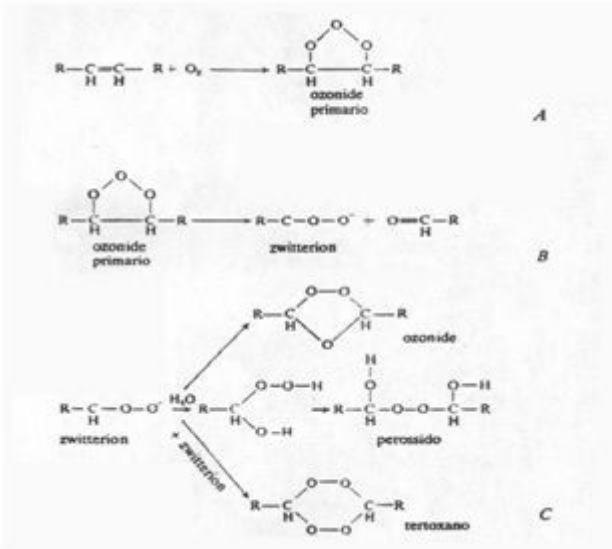
Allo stato gassoso la sua decomposizione è rappresentata dalla reazione:

$$2O_3 = 3O_2$$

Nei liquidi biologici i substrati con i quali l'ozono di preferenza reagisce sono gli acidi grassi insaturi (si usa l'acronimo anglosassone PUFA) e i composti riducenti (cioè donatori di elettroni), come il glutatione ridotto (GSH) e le proteine ricche di cisteina.

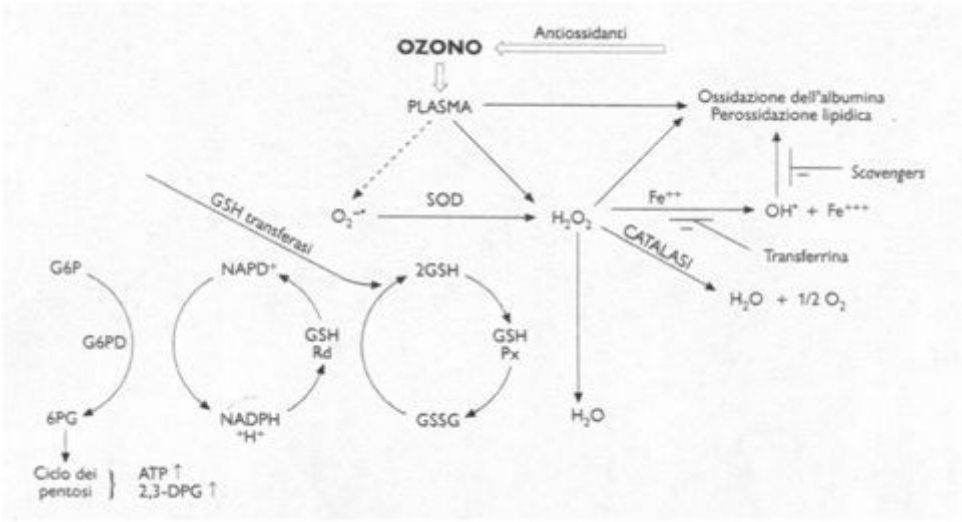


L'emivita dell'O3 si abbrevia con l'aumentare della temperatura. A + 20° è di 40 minuti



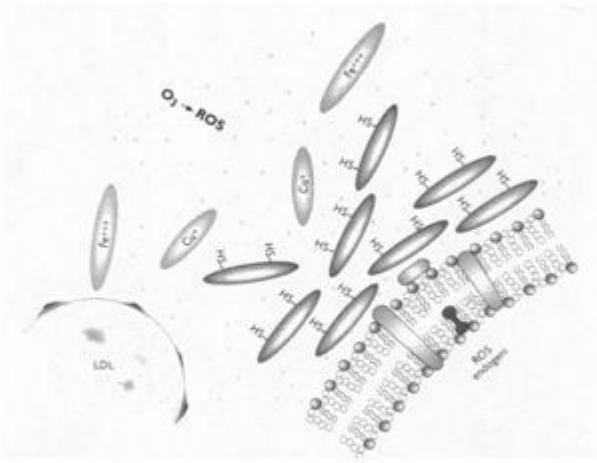
Meccanismo di Criegge di ozonolisi di sostanze organiche insature (contenenti un doppio legame carbonico). A) Formazione dell'ozonide primario molto instabile. B) L'ozonide primario si scompone dando origine allo zwitterion. C) Lo zwitterion, in presenza di acqua o di altri solventi reattivi, dà origine ai perossidi. [2,58,59,]

MODIFICAZIONI BIOCHIMICHE



La complessa serie di modificazioni biochimiche evocate durante l'esposizione del sangue umano all'O3. Questo si discioglie nell'acqua del plasma e istantaneamente reagisce con una serie di substrati ossidabili e con gli antiossidanti solubili come acido urico, acido ascorbico, e albumina. La formazione di un leggero eccesso di H2O2 diffondendo nelle cellule, può attivare numerose vie metaboliche. L'eccesso di H2O2 è prontamente ridotto dal sistema antiossidante intracellulare.

OZONIZZAZIONE DEL SANGUE ATTUANDO UNO "STRESS OSSIDATIVO CALCOLATO E TRANSITORIO" CON 7-8 MG O3



Contenuto di antiossidanti in 100 ml di sangue:

- acido ascorbico - 1,5 mg
- acido urico - 4.5 mg
- glucosio - 80,0 mg
- albumina - 2700 mg
- bilirubina - 0,8 mg

cisteina, GSH, ecc.

Uno schema per immaginare la molteplicità dei substrati reagenti con l'ozono disciolto nell'acqua del plasma. Piccoli punti, quadrati e rettangoli indicano le molecole degli antiossidanti idrosolubili (acido urico, ascorbico, glucosio, cisteina, ecc.). Le grandi molecole albuminiche, ellissoidi, contengono molti gruppi —SH esposti e si dispongono come una nube protetiva sulla membrana eritrocitaria, in cui è visibile lo strato bimolecolare costituito dai fosfolipidi e dal colesterolo. Molecole quali transferrina e ceruloplasmina legano Fe3+ e Cu+. Parte di una molecola lipoproteica è visibile sul quadrante inferiore sinistro. In contrapposizione all'ozono come fugace ossidante esterno abbiamo l'incessante produzione dei ROS endogeni. Al confronto, l'attacco dell'ozono è transitorio e ben controllabile.

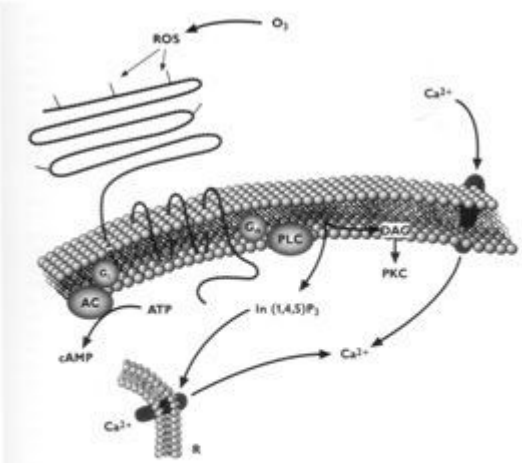
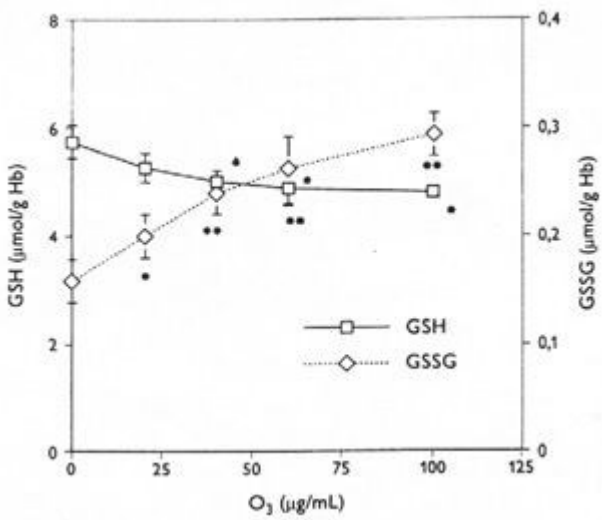


Figura 22 Il dominio extracellulare glicoproteico di un recettore di membrana emerge molto al di fuori dello strato bimolecolare fosfolipidico e alcuni gliceridi possono essere ossidati da ROS plasmatici. Può conseguirne l'attivazione di attività enzimatiche (adeniltociclasi, AC; fosfolipasi C, PLC; protein chinasi C, PKC) e l'apertura di canali ionici per i Ca^{2+}, Na^+ con depolarizzazione cellulare e aumentate attività metaboliche. DAG: diacilglicerolo; IP_3: inositolo-1,4,5-trifosfato; G: proteine G; cAMP: acido adenosin monofosfato ciclico.

Mentre l'ozono disciolto nelle soluzioni si decompone in pochi microsecondi, si formano diversi composti in gran parte derivati dalla perossidazione dei PUFA denominati da Pryor et al. (1995) [58] con l'acronimo LOP, cioè lipid oxidation products, ed eventualmente, per un'eccessiva dose di ozono, dall'ossidazione di proteine, aminoacidi e acidi nucleici.

Se questi ultimi composti possono essere usati come biomarcatori di tossicità, i radicali perossilici, gli idroperossidi, gli isoprostani e alcune aldeidi potrebbero a bassi livelli plasmatici avere un potenziale ruolo di messaggeri, Madden et al., 1993 [63] ; Serhan 1994 [64]; Serhan et al., 1996 [56] ; Morrow e Roberts, 1997 [55] ; Parola et al., 1999 [79].

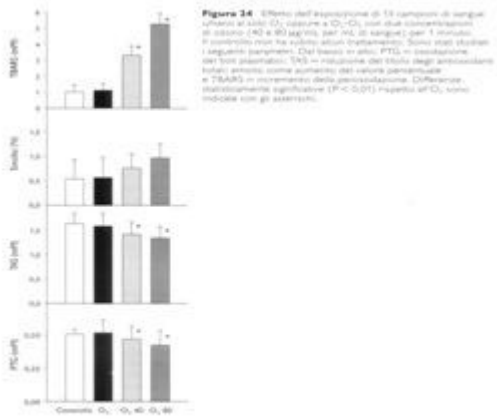
E questo apre la porta ad un'infinita materia di ricerca che puó, in alcuni casi, spiegare il motivo della versatilità di questa molecola.



Il diagramma dimostra come il GSH intraeritrocitario, ossidandosi in presenza di O3 può evitare il danno cellulare. Il sangue umano era esposto a concentrazioni di O3 fino a 100 µg/mL per mL di sangue, quindi molto superiore alla concentrazione che si usa in campo medico. L'ossidazione del GSH genera GSSG che potrà essere successivamente ridotto a GSH Shinriki et al., 1998 [52] .

Il declino del GSH intra-eritrocitario è modesto (al massimo del 20%) e, entro 15-30 minuti, il livello si ripristina indicando un'ottima funzionalità del sistema redox. E' evidente che la cascata dei ROS generata dopo la solubilizzazione dell'ozono nel plasma ha una azione lesiva minima. Questo è un primo punto cardine che ci rende ragione di come l'ozono vada a determinare un equilibrio nelle ossidoriduzioni.

Non si sono rilevati danni a carico di enzimi quali Na/K-ATPasi, acetilcolinesterasi, SOD, GSH-Px, GSH reduttasi e catalasi, suggerendo che il sistema antiossidante protegge adeguatamente (fino alla concentrazione di 100 µg/mL di ozono) la globina e i vari enzimi impedendone la denaturazione Shinriki et al., 1998 [52]. Se le aldeidi generate durante l'ozonizzazione avessero formato degli addotti con queste proteine, avremmo dovuto osservare una riduzione dell'attività enzimatica.



Un'altra fondamentale attività esercitata dall'ozono si sviluppa sul metabolismo dei glucidi

- La demolizione aerobica del glucosio libera energia utilizzata per la sintesi di ATP.
- Nelle patologie degenerative ed infiammatorie e nel muscolo scheletrico sottoposto a sforzo violento aumenta la richiesta di ATP.
- Aumenta quindi la velocità dei processi ossidativi mitocondriali che soltanto in parte porta a compensare la maggior richiesta di ATP.

L'ozono, accelerando il processo di glicolisi, garantisce una costante riossidazione del NADH conducendo ad una aumentata sintesi di ATP e quindi di una maggiore risposta alle patologie infiammatorie acute e / o degenerative croniche.

Campioni di sangue incubati con la miscela O2O3 hanno evidenziato un incremento della produzione da parte dei leucociti di chemochine ed in particolare di interferone γ (IFN γ) e di transforming growth factor (TGF-β1).

Questo fenomeno potrebbe dipendere:

- dall'azione diretta dell'O3
- dalle attivazioni geniche che la perossidazione lipidica ed i suoi prodotti esercitano sui diversi tipi cellulari.

EVIDENCE FOR ANTIBODY – CATALYZED OZONE FORMATION IN BACTERIAL KILLING AND INFLAMMATION

P. Wentworth Jr., J. E. McDunn, A. D. Wentworth, C. Takeuchi, J. Nieva, T. Jones, C. Bautista, J. M. Ruedi, A. Gutierrez, K. D. Janda, B. M. Babior, A. Eschenmoser, R.A. Lerner

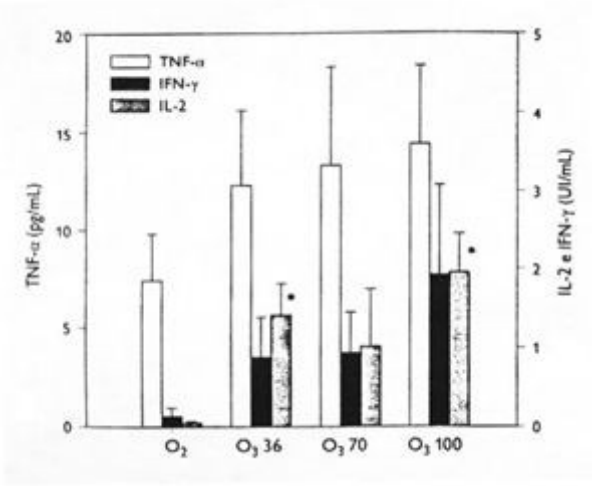
Science 298: 2195-2199, 2002

Attivitá sul sistema immunitario

Occorre ricordare che l'IFN è una proteina prodotta da cellule epiteliali, dai linfociti durante uno dei tanti possibili contatti delle nostre cellule con agenti estranei (induttori) quali virus, tossine ed anche agenti ossidanti quali acqua ossigenata, periodati e gattalosio ossidasi

Le attivazioni osservate suggeriscono un potenziamento, nei campioni di sangue, delle difese immunitarie aspecifiche.

Diversi studi sulle cellule mononucleate, cioè linfociti e monociti, hanno dimostrato la produzione di IFN-γ Bocci e Paulesu, [65], e accertato il rilascio di IFN-β, di altre citochine, cioè l'interleuchina (IL) 2,6,8, del cosiddetto fattore della necrosi tumorale (TNF-α), del fattore di crescita β (TGF-β) e di una granulopoietina (GM-CSF) Paulesu et al., 1991 [65]; Bocci et al., [54,62,].



Effetto di crescenti concentrazioni di O3 36, 70 e 100 μg/mL per mL di sangue sulla produzione di TNF-α, IFN-γ e IL-2 in campioni di sangue di 3 donatori dopo incubazione a 37° C in aria-CO2 (pH 7,4) per 9 ore. Le differenze significative (P<0,05) sono indicate con l'asterisco rispetto al controllo (solo O2).

Su colture di cellule endoteliali umane esposte brevemente a plasma ozonizzato è stata evidenziata una maggiore produzione di NO che può far pensare ad una vera e propria induzione di NO sintetasi. Tale enzima trasforma la L-arginina in L-citrullina con liberazione di NO, che agendo sui recettori delle cellule muscolari lisce attiva la guanilato ciclasi.

La formazione di guanosina monofosfato ciclica dalla guanosina trifosfato sembra responsabile del rilassamento muscolare e quindi della vasodilatazione.

Le cellule endoteliali contengono costitutivamente la NO sintetasi in quanto la produzione di NO è pressochè continua come fattore fisiologico dilatante (antagonista delle endoteline, leucotriene LTB4, ecc.) e regolatore del tono vasale.

Notiamo che l' NO per molti anni era stato considerato una molecola potenzialmente tossica.

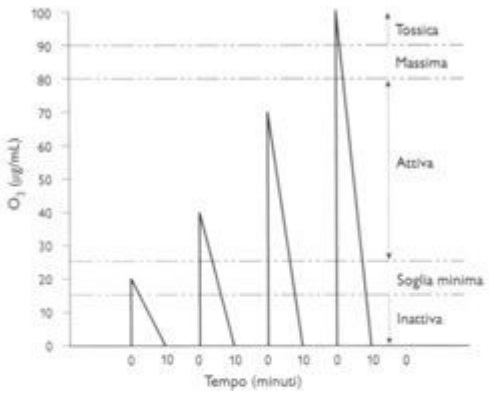
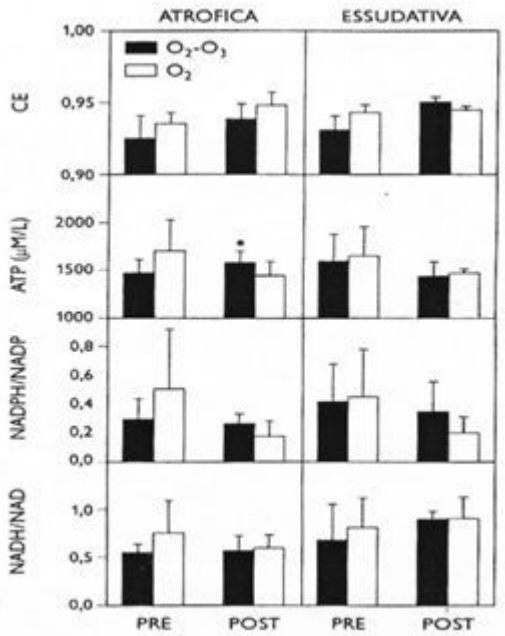


Figura 25 Una rappresentazione schematica della «finestra terapeutica» dell'O_3. Concentrazioni di O_3 inferiori a 20-25 µg/mL producono ROS quasi completamente neutralizzabili dagli antiossidanti ematici. Se il livello dei ROS non supera il valore di soglia, che ha grande variabilità individuale, gli effetti bioterapeutici saranno minimi e prevarrà l'effetto placebo. In base alle attuali conoscenze, concentrazioni di O_3 superiori a 80 µg/mL potrebbero produrre un eccesso di ROS con possibili effetti tossici (emolisi, eccessiva perossidazione).



Un concetto fondamentale è rappresentato dalla cosiddetta ''Finestra terapeutica'', vale a dire la concentrazione ottimale alla quale l'ozono puó essere somministrato, quindi né troppo poca né troppa, al fine di condurre al meglio l'efficacia per ogni patologia.

Modificazioni dei livelli di ATP, della carica energetica e dei rapporti NADPH/NADP e NADH/NAD attivando il sistema enzimatico mitocondriale.

Dall'analisi della figura si evidenzia che l'ATP è aumentata al termine del ciclo terapeutico, indicando un aumento della sintesi non negli eritrociti immediatamente durante l'ozonizzazione, ma soltanto a seguito di una lenta immissione in circolo di eritrociti funzionalmente più attivi prodotti dal midollo in risposta a mediatori ancora sconosciuti.

Si può pensare che durante la terapia aumentino le esigenze biosintetiche ed energetiche così da attivare la glicolisi eritrocitaria Chow e Tappel, 1973 [66]; Buckley et al., 1975 [67]; Freeman et al., 1979[68]; Hernandez et al., 1995 [57].

ATTIVITÁ DELL'OZONO SUL DOLORE [2]

I mediatori del dolore derivano da:

- Lipidi: ac. Arachidonico, prostanoidi ed eicosanoidi, prostaglandine
- Proteine: NGF (nerve growth factor), SP, NK, CGRP
- Altre molecole: dal contenuto citoplasmatico, glutammato, K+, ATP, eicosanoidi, idrogenioni
- Dalle terminazioni nervose: SP, NK, GCRP, YIP
- Dal sangue e tessuto infiammato: serotonina, bradichinine

- Un ruolo particolare nella reazione infiammatoria viene svolto da:
- Fosfolipasi A2, che oltre alla formazione di prostaglandine e leucotrieni attacca i fosfolipidi delle membrane perineurali e neurali.
- Metalloproteasi che attaccando il tessuto discale amplificano la risposta infiammatoria.
- L'ultimo in ordine di scoperta è il YKL4, una glicoproteina di recente identificazione che viene prodotta abbondantemente in seguito a lesioni articolari (anche di tipo degenerativo)

Azione sulla risposta infiammatoria cellulo-mediata [2]

L'ozono migliorando l'ossigenazione, inibendo l'attivazione e l'adesione leucocitaria, piastrinica, inibisce l'attivazione della fosfolipasi A2, delle ciclossigenasi e delle metalloproteasi [2].

Grazie a tale intervento verrà inibita la risposta infiammatoria bio-umorale.

L'iniezione di ozono nel sito doloroso, può determinare [2]:

Effetto antalgico immediato del dolore immediato perché:

- Inattiva o distrugge sostanze algogene p.s. ossidando le prostaglandine
- Inattiva le bradichinine ed altri peptidi
- Altera la serotonina che ha un nucleo indolico
- Produce una degradazione di ATP extracellulare
  Mentre l'effetto antalgico duraturo dell'ozono puó essere spiegato attraverso:
- Denaturazione di proteine cellulari che producono sostanze algogene ps le cx o il chininogeno o la callicreina
- Alterazione del sito recettoriale delle sostanze algogene
- Aumento espressione di geni ad attività antinocicettiva

MEDIATORI CHIMICI DELL'INFIAMMAZIONE COINVOLTI NELLA PATOLOGIA DISCALE

Fosfolipasi A2 (PLA2)

- Il materiale discale erniato contiene livelli molto alti di PLA2.
- La PLA2 è un potente induttore della reazione infiammatoria in quanto la sua azione enzimatica sull'acido arachidonico porta alla produzione di mediatori chimici maggiori di infiammazione quali le prostaglandine ed i leucotrieni.
- Inoltre, la PLA2 può danneggiare direttamente le fibre nervose attaccando i fosfolipidi di membrana del nervo e della guaina perineurale.

Metalloproteinasi (MMPs)

c'è una produzione di questi enzimi che, attaccando il tessuto discale, incrementa la reazione infiammatoria

Prostaglandina E2 (PGE2)

induttore potente della reazione infiammatoria; essa è prodotta direttamente dal tessuto discale o anche con l'intervento enzimatico della PLA2; lo stesso discorso vale per l'**interleukina 6 (IL6)**.

ATTIVITÀ ESERCITATA DALL'OZONO SULLA

COMPONENTE BIOUMORALE DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA

- Inibizione della sintesi di prostaglandine pro-infiammatorie
- Inibizione della liberazione di bradichinina e composti algogeni
- Neutralizzazione dei ROS endogeni e stimolazione della produzione locale di enzimi antiossidanti.

Circolazione cerebrale e autoregolazione

In questo studio l'attenzione è stata posta su come la terapia considerata modifichi la circolazione e l'ossigenazione cerebrale. É quindi necessario richiamare alcuni concetti fondamentali sull'anatomia e la fisiologia delle zone che sono state oggetto di analisi.

L'encefalo insieme al cervelletto e al tronco encefalo è sede delle attività motorie, sensitive e delle facoltà intellettive, è contenuto nella scatola cranica, che ha il ruolo di proteggerlo.

Dal punto di vista esteriore, l'encefalo appare costituito da due masse distinte, gli emisferi cerebrali, caratterizzati da una superficie ricca di solchi e scissure che li suddividono nei lobi: frontale, temporale, parietale , occipitale e l'insula.

I due emisferi cerebrali sono uniti tra loro da un grosso fascio di fibre nervose, il corpo calloso, che consentono il collegamento e lo scambio di informazioni tra la parte destra e sinistra. I due emisferi non hanno infatti gli stessi compiti, ma predominano uno sull'altro a seconda delle funzioni da svolgere e della soggettività dell'individuo.

Come in qualsiasi altro compartimento fisiologico, anche il flusso sanguigno nei capillari cerebrali è normalmente sottoposto a continue modifiche, in quanto il cervello è in grado di modificare il diametro dei propri vasi in modo che l'apporto di ossigeno e di altri nutrienti sia sempre ottimale.

Questo meccanismo, noto come autoregolazione cerebrale, permette di rispondere ad una perturbazione esterna di tipo meccanico (ad esempio una variazione della pressione sanguigna sistemica) o di tipo metabolico (come l'incremento di CO2 nel sangue in seguito ad apnea) andando a variare la resistenza cerebrovascolare (vasoreattività cerebrale).

Il controllo del flusso ematico locale può essere suddiviso in due fasi: un controllo a breve termine ed uno a lungo termine.

Il controllo a breve termine si realizza con veloci cambiamenti del grado di costrizione locale della arteriole, delle meta-arteriole e degli sfinteri precapillari ed avviene nel giro di pochi secondi o minuti, al fine di garantire e mantenere un flusso sanguigno appropriato alle esigenze locali.

Il controllo a lungo termine, invece, è dovuto a variazioni lente del flusso che richiedono giorni, settimane o perfino mesi. In generale queste variazioni consentono un migliore controllo del flusso in rapporto alle esigenze dei tessuti e sono il risultato di un aumento o di una riduzione del calibro e del numero dei vasi sanguigni che irrorano i tessuti.

L'autoregolazione avviene per variazioni della pressione di perfusione cerebrale (CPP) comprese tra 60 mmHg (LLA, Lower Limit of the Autoregolation) e 150 mmHg (ULA, Upper Limit of the Autoregolation). All'interno di questo range, il flusso sanguigno cerebrale (CBF) non subisce variazioni significative.

La pressione di perfusione è legata alla pressione arteriosa sistemica (SAP) dalla pressione intracranica (ICP), secondo la relazione:

$$CPP = SAP -- ICP$$

Per esplicitare la relazione tra la CPP e il CBF ricorriamo alla legge di Poiseuille. Essa vale per un fluido viscoso che scorre in un condotto di sezione circolare con raggio r e lunghezza L, e lega il flusso alla variazione di pressione ΔP

$$F\ (flusso) = \frac{\pi r^4 \ \Delta P}{8\eta \ L}$$

dove η rappresenta la viscosità del fluido considerato.

Mettendo insieme le relazioni precedenti è possibile esprimere il flusso ematico cerebrale come:

$$CBF = \frac{CPP}{R} = \frac{SAP - ICP}{R}$$

Se la pressione intracranica non varia, per mantenere il flusso ematico cerebrale costante, le resistenze vascolari delle arterie cerebrali aumentano (vasocostrizione) quando la pressione arteriosa sistolica aumenta e si riducono (vasodilatazione) quando la pressione arteriosa sistolica diminuisce (Figura 2).

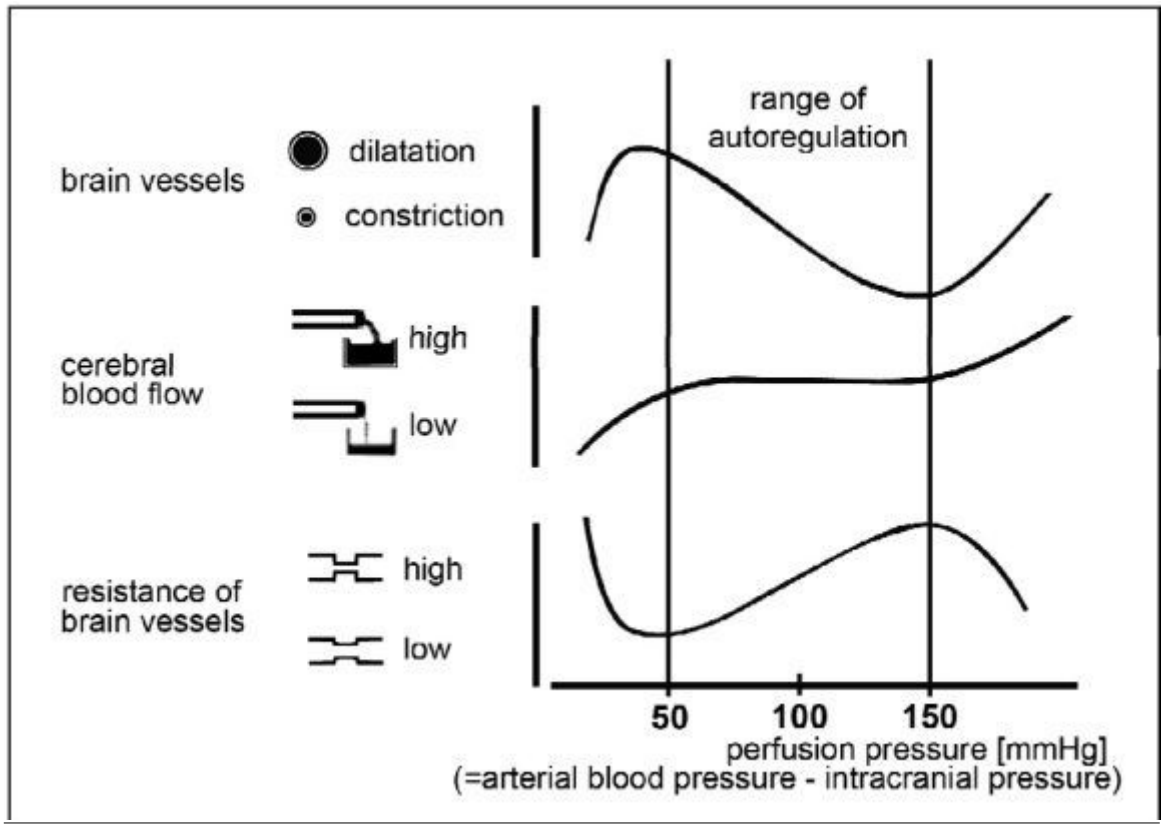


Figura 2: Variazione del diametro dei vasi cerebrali (in alto) e delle resistenze vascolari (in basso) al variare della pressione di perfusione cerebrale, col fine di mantenere costante il flusso ematico cerebrale (al centro).

Al di fuori dei limiti LLA e ULA, il meccanismo di autoregolazione ora descritto non è più efficace, ed il flusso può essere compromesso se la pressione è troppo bassa o può aumentare rapidamente provocando anche la rottura dei vasi se la pressione è troppo alta.

Avere un flusso adeguato di sangue è fondamentale per il cervello, in quanto le sue cellule si nutrono dell'ossigeno trasportato per mezzo dell'emoglobina.

Quest'ultima è una proteina globulare contenuta negli eritrociti (una delle componenti corpuscolari del sangue), costituita da quattro gruppi eme, ognuno dei quali è in grado di legare in modo reversibile una molecola di ossigeno a livello polmonare, per poi liberarlo a livello dei capillari tissutali.

L'emoglobina legata all'ossigeno viene definita emoglobina ossigenata o ossiemoglobina, mentre quella non legata è detta emoglobina deossigenata o deossiemoglobina. Al sangue spetta anche il compito di portare via dai tessuti l'anidride carbonica (prodotto di scarto del metabolismo cellulare), affinché possa essere espulsa tramite la respirazione.

Il meccanismo con il quale l'ossigeno si lega all'emoglobina o ne viene rilasciato è complesso, ma dipende principalmente da una variabile, la pressione parziale ematica di ossigeno (PO2): nei capillari polmonari questa è molto elevata e permette quindi all'ossigeno di legarsi all'emoglobina, mentre nei tessuti periferici è molto bassa, e quindi l'ossigeno viene rilasciato.

In Figura 3 è riportato l'andamento della curva di dissociazione dell'emoglobina.

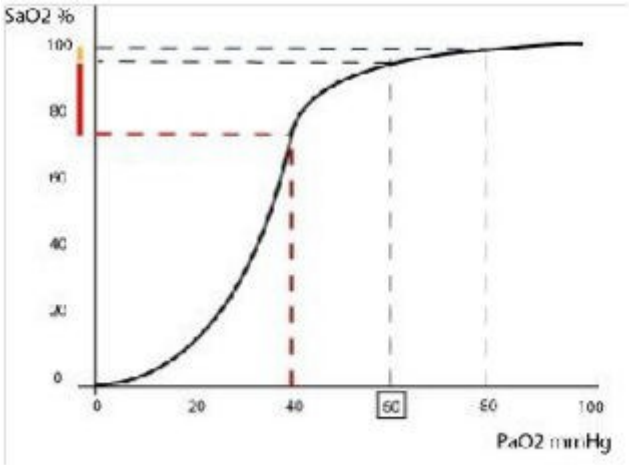


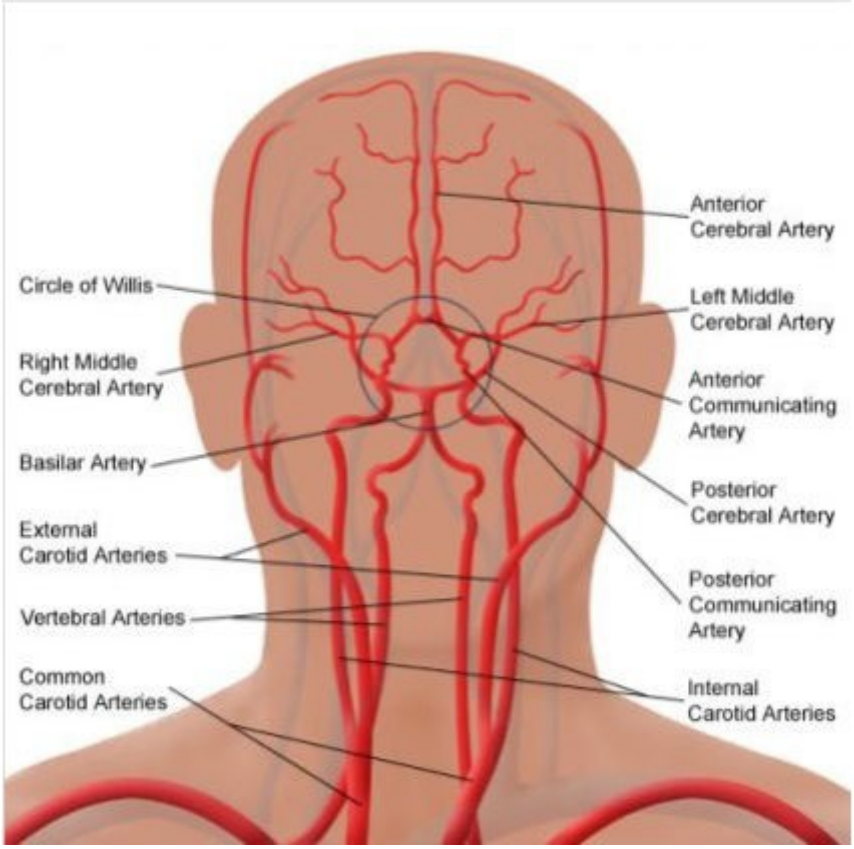
Figura 3: Curva di dissociazione dell'emoglobina

L'asse delle ordinate rappresenta la percentuale di saturazione, ovvero la percentuale di emoglobina legata a molecole di ossigeno, mentre in ascissa è riportata la PO2. La curva ha un andamento marcatamente sigmoidale, in quanto i gruppi eme variano la loro affinità per l'O2 al variare della PO2. In particolare, l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno aumenta ogni volta che una molecola di ossigeno si lega ad essa, facendo incrementare la pressione parziale di ossigeno, fino a raggiungere un massimo di saturazione.

Si può notare che l'ossiemoglobina risulta essere meno sensibile a variazioni di PO2 nel range di pressioni che va da 60 a 100 mmHg. Ciò significa che ad alte PO2 un incremento ulteriore della pressione parziale di ossigeno provoca solamente un lieve aumento della saturazione, mentre per valori più bassi (tra 0 e 40 mmHg), anche un piccolo aumento di pressione fa aumentare sensibilmente la saturazione. Questo risulta molto favorevole in caso di scarsa disponibilità di ossigeno. L'organismo umano possiede numerose difese per cercare di evitare che, per qualsiasi ragione, una o più zone del cervello rimangano senza il corretto apporto di ossigeno e possano quindi subire danni. Uno di questi è l'alto grado di ridondanza bilaterale della struttura arteriosa: se per qualsiasi motivo la zona destra

dell'encefalo non può ricevere sufficiente sangue, il flusso proveniente da sinistra è in grado di irrorare in maniera adeguata anche la parte destra, e viceversa.

Il circolo arterioso dell'encefalo è chiamato circolo (o poligono) di Willis (Figura 4).



Le arterie carotidi interne permettono al sangue arterioso di entrare nell'encefalo, insieme alle due arterie vertebrali, che si uniscono dando vita all'arteria basilare. A questo punto il sangue entra nel circolo vero e proprio: il tratto anteriore è costituito dalle due arterie cerebrali anteriori, collegate tra loro dall'arteria comunicante anteriore; il tratto medio è costituito dalle arterie cerebrali medie; il tratto posteriore è formato dalle arterie comunicanti posteriori e dalle due arterie cerebrali posteriori (destra e sinistra), generate dalla biforcazione dell'arteria basilare.

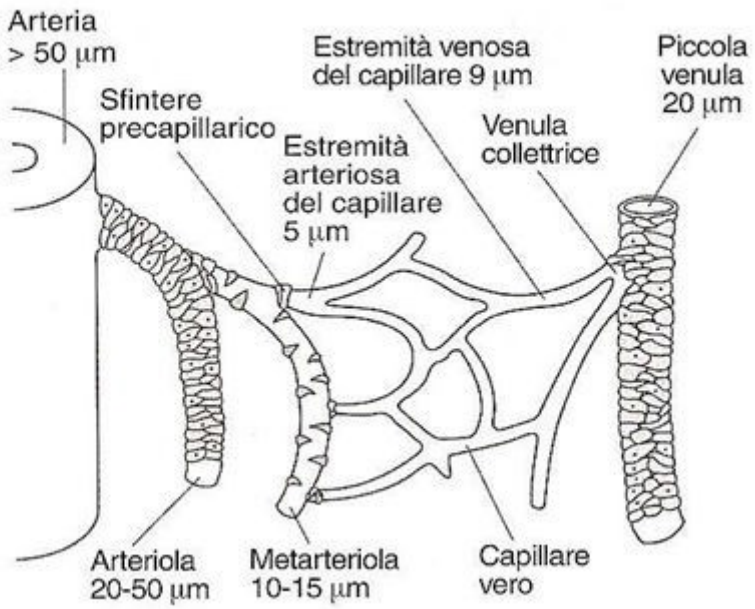
Ogni zona del cranio è irrorata da un diverso tratto del circolo. Infatti il tratto anteriore si occupa della vascolarizzazione della superficie mediale degli emisferi ed il lobo frontale anteriore, il tratto medio della superficie laterale dell'encefalo e di molte strutture profonde, mentre il tratto posteriore vascolarizza la superficie basale degli emisferi.

DISCUSSIONE: Azioni terapeutiche dell'ozono sul microcircolo

Il microcircolo è costituito dalle arteriole con diametro di 20-50µ, meta-arteriole con diametro di 10-15µ, capillari con diametro di 5-9µ. Le meta-arteriole hanno una muscolatura liscia , il flusso nei capillari è controllato da sfinteri muscolari pre-capillari . La superficie del microcircolo è molto vasta , se noi distendiamo su un piano la superficie dei capillari otteniamo una superficie di 6.000 mq, tramite la quale il sangue scambia i suoi fattori nutritivi e l'ossigeno con i tessuti e il liquido interstiziale e riassorbe i prodotti del catabolismo cellulare e l'anidride carbonica. Il flusso all'interno del distretto capillare avviene per una differenza di pressione , all'estremità arteriosa la pressione è di 32 mmhg mentre all'estremità venosa è di circa 15 mmhg. I capillari sono estremamente corti, 0,1-0,15 mm, il tempo di transito degli eritrociti è molto lungo, 1-2 secondi , una velocità di flusso estremamente bassa, non confrontabile con la velocità di flusso nell'aorta e nelle iliache ove è circa 100 cm secondo.

Il diametro del globulo rosso è in genere più grande del diametro del capillare , che ha un diametro di circa 5-8 µ, pertanto il globulo rosso si deve deformare , deve adattarsi al diametro del capillare, diventare più piccolo per poterlo attraversare.

Secondo la legge di Poiselle il flusso ematico in un sistema di tubi rigidi è direttamente proporzionale alla differenza di pressione fra gli estremi del tubo considerato e direttamente proporzionale alla quarta potenza del raggio. Una piccola riduzione del raggio determina una notevole riduzione del flusso, Il flusso ematico è inversamente proporzionale alla lunghezza del vaso ed alla viscosità ematica, cioè la resistenza al flusso ed alla deformabilità dei globuli rossi, la viscosità ematica è influenzata dall'ematocrito , dalla concentrazione del fibrinogeno , dalle globuline sospese nel plasma , dalla deformabilità dei globuli rossi , dall'aggregazione delle piastrine e dai leucociti, che sono cellule più grandi e più indeformabili dei globuli rossi.



Attraverso parete capillari, scambi essenziali :

O_2 e sostanze nutritizie entrano nel liquido interstiziale;

CO_2 e prodotti rifiuto entrano nel torrente sanguigno.

Pressione: estremità arteriosa, 32mmHg; estremità venosa, 15 mmHg

Lunghezza dei capillari: 0,10 – 0,15 mm ***(corti)***

Tempo di transito : **1-2 sec** **[Velocità di flusso:** circa 0,07mm / s ***(lento)*** **]**

Diametro del globulo rosso 8-16µ

Diametro del capillare: 5-8µ

L'ozono può essere utilizzato in tutte le forme morbose in cui vi è un ridotto apporto di ossigeno perché ha un effetto di riattivazione del microcircolo ed azione protettiva multi-organo:

- Arteriopatie periferiche arti inferiori [15,28,35,43,46,49,60]
- Cardiopatia ischemica [5,38,57,]
- Insufficienza renale vascolare [8,11,15,49,61]
- Malattie cerebrovascolari [1,6,9,10,31,41,56]
- Maculopatia degenerativa della retina [15,34,38,67]

- L'ozono induce un aumento della deformabilità e filtrabilità eritrocitaria perché spezza le lunghe catene degli acidi grassi mediante lipoperosidazione controllata.
- Aumenta la produzione del 2/3 difosfoglicerato con maggiore cessione di ossigeno ai tessuti periferici, spostando verso destra la curva di dissociazione dell'emoglobina.
- Riduce l' aggregabilità piastrinica e la viscosità plasmatica
- Riduce il fibrinogeno plasmatico
- Riattiva il metabolismo energetico a livello mitocondriale con aumento della produzione di ATP.
- Determina aumento del flusso ematico , del rilascio di ossido nitrico a livello degli sfinteri pre-capillari da parte delle cellule endoteliali.
- L'ozono ha una azione anti infiammatoria, determina una riduzione della produzione delle prostaglandine agendo sull'acido arachidonico
- Ha una azione antiossidante attivando le funzioni enzimatiche anti ossidanti protettive endogene delle cellulle.

Le prime applicazioni dell'ozonoterapia sulle patologie del microcircolo è stata sull'arteriopatia obliterante periferica, in Italia, presso l'Università di Napoli di Pavia e Siena. In Lombardia e in Campania tale procedura è erogata dal SSN.

In Europa e in Nord America 27 milioni di soggetti sono afflitti da PAD , cioè patologia arteriosa periferica, il 16% della popolazione è al di sopra dei 55 anni. Di questi 16.500.000 sono asintomatici e 10.500.000 sintomatici (Jill J. F. Belch *et al. for* The Prevention of Atherothrombotic Disease Network Arch Intern Med 2003; 163: 884-92).

In uno studio Americano del 2004 la prevalenza della PAD cresce con l'età, Michael Sobel and Raymond Verhaeghe Antithrombotic therapy for peripheral artery occlusive disease: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). L'arteriopatia obliterante periferica può essere asintomatica , i primi segni sono la claudicatio intermittens, cioè il dolore e la necessità di fermarsi durante la deambulazione, fino all'ischemia critica e le ulcere trofiche. Non si muore di PAD, essendo una manifestazione della malattia cardiovascolare da alterazione del microcircolo, i pazienti muoiono per ictus ed infarto al miocardio. La PAD è un fattore di rischio che ci deve allertare per il danno vascolare del cuore e del cervello, con una mortalità del 30%. Nel 70-80% dei pazienti asintomatici a cinque anni il quadro si stabilizza o migliora perché si formano i circoli collaterali, un 20-30% richiede terapia farmacologica , trattamenti chirurgici e di rivascolarizzazione endovasale, meno del 3% amputazione maggiore.

L'attività fisica come dimostrato da numerosi studi clinici ha un'evidenza di tipo A. La pentossifillina in uso da 30 anni ha un effetto emereologico che modifica la deformabilità dei globuli rossi, vasodilatazione ed inibizione piastrinica, ha evidenza di tipo A. La rivascolarizzazione è utile in pazienti selezionati a seguito di fallimento della terapia medica. Secondo la Società Americana di Chirurgia vascolare su 8000 angioplastiche o applicazioni di stent a livello dell'iliaca o poplitea la pervietà dei vasi è del 60-80% ma comunque si sono formati i circoli collaterali.

Le linee guida internazionali non prevedono l'ossigeno-ozonoterapia per le patologie vascolari, nel 1996 il ministero della salute ha indicato che per la sua azione sul microcircolo può essere utilizzata sperimentalmente nel piede diabetico, nell'ischemia cronica degli arti inferiori e ha dato supporto alla sua applicazione in ambienti universitari e ospedalieri.

Attualmente viene praticata presso i reparti di Geriatria dell'Univesità di Napoli e Pavia, in vari Ospedali in Lombardia, di Cremona, Milano , in particolare presso l'Ospedale Tribuzio dove ci sono circa dieci medici che la applicano nelle patologie geriatriche.

Si è riscontrato che nei pazienti affetti da arteriopatia obliterante degli arti inferiori 3° e 4° stato di Fontain, mediante cicli di grande autoemoinfusione (GAE) si è riscontrato scomparsa di dolore e regressione delle ulcere trofiche. Non si sono riscontrate interferenze con altri trattamenti (specialmente in soggetti con poli-patologie) e nessuna reazione avversa.

Ulcera flebo-statica prima del trattamento.

Dopo trattamento con GAE.

GAE: grande autoemoinfusione di sangue ozonizzato

Ozone therapy and peripheral vascular disease/ Ozone therapy and intermittent claudication – (SIOOT / Prof. Luongo SUN)

	Pazienti	Amputazioni (%)	Effetto sul dolore
Scroczynski J. et al. **Pol Tyg Lek 1992**; 47:42-43 (Polish)	50 ischemie aterosclerotiche degli arti inferiori; 49 pazienti diabetici.	-	Allungamento intervallo claudicatio (**> doppio**)
Romero Valdes A. et al. **Angiologia 1993**; 45: 146-148 (Spanish)	15 pazienti (stadio avanzato di arteriosclerosi obliterante arti inferiori)	Riduzione (26,7%)	Riduzione(13,3%) bisogno procedure chirurgiche per dolore
Cooke ED et al. **Int Angiol 1997**:4: 250-4	4 severe sindromi di Raynaud	-	Riduzione o scomparsa attacchi Raynaud per 3 mesi dopo il trattamento
Tylicki I. et al. **Int J Artif Organs 2001**;24: 79-82 (Polish)	5 pazienti emodializzati; 7dialisi peritoneali	-	Riduzione intensità percepita del dolore. Prolungamento intervallo claudicatio
Di Paolo et al. **Int J Artif Organs 2005**; 29: 1039-50 (Polish)	28 pazienti con PAD randomizzati a EBOO o prostacyclin intravenosa	-	Positivo effetto sulle lesioni cutanee e su condizioni generali paziente

È stato studiato l'effetto dell'ossigeno Ozonoterapia nell'ischemia nel miocardio su ratti sottoposti ad ischemia miocardica acuta e riperfusione [38] presso la Seconda Università di Napoli. Gli animali sono stati trattati con una miscela di ossigeno-ozono di 100, 150 e 300 mg/kg insufflata per via intraperitoneale un' ora prima del danno ischemico e sono stati misurati le dimensioni dell'infarto ma i marker di necrosi e di danno tessutale, la nitrotirosina, CD68, CD8, CD4 e le caspasi-3. I risultati hanno evidenziato una minore dimensione dell'area infartuale nei ratti pretrattati con l'insufflazione della miscela di ossigeno-ozono e la parallela diminuzione dei livelli tissutali di nitrotirosina e dei marker dell' infiammazione (CD68) e della risposta immunitaria (CD8 e CD4) . Questi dati indicano che i danni associati ad ischemia e riperfusione miocardica possono essere contrastati da un pretrattamento con la somministrazione della miscela gassosa di ossigeno-ozono per via sistemica .

Un recente studio sperimentale [11] ha valutato gli effetti della somministrazione sistemica della miscela di ossigeno-ozono mediante GAE nella protezione del rene di ratto dal danno da ischemia e da ischemia / riperfusione. È stata eseguita una GAE 30 min prima dell'induzione di 60 min di ischemia renale o l'induzione di 60 min riperfusione

post-ischemica in ratti sottoposti a nefrectomia unilaterale. In aggiunta, per evidenziare la possibile protezione indotta da O2/O3 sulle funzioni dell'endotelio, lo stesso studio ha analizzato gli effetti in vitro di O2/O3 sul consumo di ossigeno da parte di cellule endoteliali della vena ombelicale umana (HUVEC). I risultati hanno evidenziato che l'ossigeno-ozonoterapia mediante GAE conserva le funzioni del rene del ratto e la stessa architettura renale, come dimostrato dai reperti istologici, riduce significativamente la congestione midollare e dilatazione tubulare, migliora i livelli di creatinina sierica e di azoto ureico nel sangue. Tale protezione non si correla con l'aumento di ossido nitrico plasmatico, ma è compatibile con un aumento focale nel rene di βNADPH-diaforasi .

Il trattamento delle cellule endoteliali della vena ombelicale umana con O2/O3 aumenta significativamente sia il tasso di consumo di ossigeno che l'attività mitocondriale. Il mantenimento dell'attività mitocondriale di endotelio in vivo potrebbe limitare la disfunzione endoteliale provocata dai processi ischemici e da ischemia/riperfusione. Agendo sul microcircolo cerebrale l'ossigeno-ozonoterapia interviene su tutte le patologie cerebrovascolari; in uno studio recente , relativamente alla patologia cerebrale ischemica indotta da radiazioni, è stato descritto il caso di un paziente di anni 75 [10], con fattori di rischio vascolare, affetto da meningioma cerebrale che è stato trattato con la radiochirurgia stereotassica. 14 mesi dopo il trattamento il paziente ha presentato un progressivo deterioramento clinico, nonostante fosse in terapia con di acido acetilsalicilico e corticosteroidi. Sono state effettuate valutazioni cliniche e di neuro-imaging prima e dopo la terapia con ozono mediante risonanza magnetica (MRI), tomografia computerizzata (TC), emissione di singolo fotone SPECT (tomografia computerizzata), e la tomografia ad emissione di positroni (PET). Lo stato del paziente e stato valutato usando indice di Barthel, Organizzazione Mondiale della Sanità / Eastern Cooperative Oncology Group Scala (OMS / Scala ECOG). L' Ozono terapia è stata eseguita con autoemoinfusione.

Le immagini basali hanno mostrato aree cerebrali con ischemia e ipometabolismo compatibile con processi ischemici da danno indotto da radiazioni.

Non ci sono stati cambiamenti nelle immagini a RM o TC dopo la terapia di ozono. Tuttavia, i miglioramenti della perfusione e del metabolismo cerebrale, correlati con il miglioramento clinico del paziente sono stati dimostrati con la SPECT e la PET.

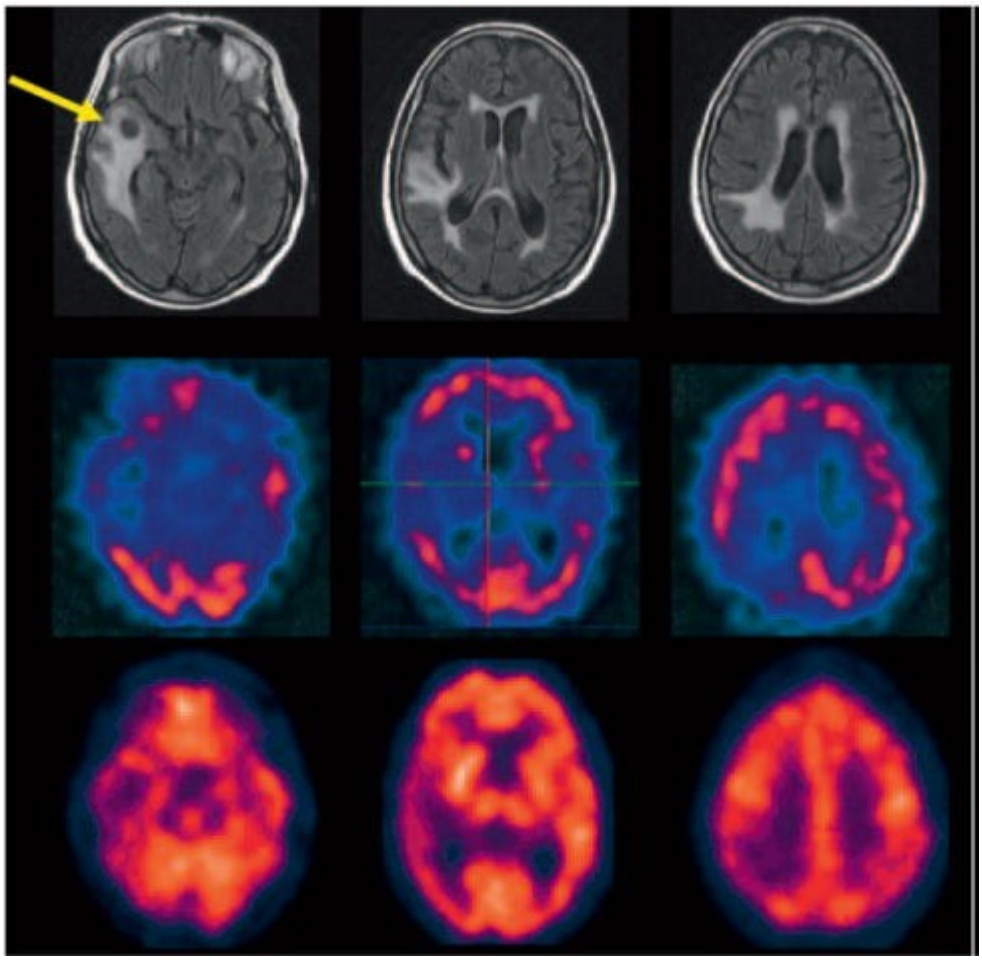


Fig. 1. Studio basale.
Pannello superiore: immagini MRI : Meningioma della porzione anteriore del lobo temporale destro (freccia gialla). Edema vasogenico, aumento del segnale a livello iuxta-corticale tempo-parietale destra e periventricolare.

Pannello centrale: ECD-SPECT immagini che mostrano diminuizione della perfusione sanguigna a livello dei lobi temporale e parietale di destra.
Pannello inferiore*:* FDG-PET : le immagini mostrano lieve aumento del metabolismo nel lobo temporale destro (meningioma) e la riduzione del metabolismo nei lobi temporale e parietale destri.
Le aree di leucoencefalopatia alla risonanza magnetica sono correlate alle aree di ipoperfusione ed ipometabolismo alla SPECT e alla PET. Tutte queste alterazioni erano compatibile con un processo cronico ischemico e / o RBI.

Le diagnosi potenziali erano : processo ischemico e / o danno indotto da radiazioni (RBI). Non era stata prospettata alcuna ulteriore opsione terapeutica , ma la famiglia del paziente ha richiesto un ulteriore trattamento. I familiari hanno scelto di procedere con l'ossigeno-ozono terapia ed hanno firmato Il consenso informato prima dell'inizio del trattamento. Nell'arco di un periodo di 11 mesi sono state effettuate 58 sedute di GAE , utilizzando un catetere venoso centrale come segue: 150 cc/m2 (sangue /superficie corporea); la

concentrazione di O3/O2 iniziale di 30 ug/ml aumentata lentamente fino a 60 ug/ml. Le sessioni avevano una bassa frequenza, progressivamente decrescente, da 3 sedute la settimana nel primo mese a una seduta al mese per gli ultimi mesi. Durante e dopo la terapia con l'ozono si è riscontrato un netto miglioramento clinico che è stato valutato con 2 scale funzionali. Lo stato clinico del paziente prima del trattamento è stato valutato 65/100 (i parametri sono da 0 a 100 ove 100 è la condizione migliore), misurato secondo l'indice di Barthel e dopo il trattamento lo stato del paziente era valutabile a 100. Le condizioni del paziente furono valutate anche secondo la scala World Sanità / Eastern Cooperative Oncology Group Scale - WHO / Scala ECOG (0-4, dove 0 è meglio) prima / dopo il trattamento si è passati da 3 a 1.

La Tabella 1 descrive la situazione clinica prima e dopo la terapia con sangue ozonizzato (GAE) e le lesioni del sistema nervoso utilizzando i criteri di danno tessutale del National Cancer Institute. Il miglioramento clinico è stato mantenuto fino all'ultimo follow-up a 30 mesi dopo aver terminato le sedute di GAE..

Non ci sono state nuovi episodi di iponatriemia . La Risonanza Magnetica e la Tomografia Computerizzata (CT) non hanno rilevato eventuali modificazioni a 4, 19, o 30 mesi. Tuttavia è stata riscontrata una aumentata perfusione cerebrale ed un aumento del metabolismo rispetto ai valori basali. La SPECT-ECD a 3 mesi di trattamento hanno mostrato un aumento globale della perfusione sanguigna a livello delle zone ischemiche tempo- parietali destre, nonché a livello dei gangli della base a destra, (fig. 2, pannello superiore). La PET- FDG a 5 mesi di ozonoterapia ha mostrato un aumento complessivo nel metabolismo (circa il 25%), anche nelle zone ischemiche ipometaboliche dei lobi temporale e parietale di destra così come nei gangli della base a destra (fig. 2, pannello inferiore). Il miglioramento clinico supportato dall'aumento della perfusione , osservato alla SPECT-ECD al 3 ° mese del trattamento, è stato mantenuto fino all'ultimo follow-up a 30 mesi dalla fine dell'ozonoterapia cioè a 40 mesi dal suo inizio .

Tabella 1.
Evoluzione clinica dei disturbi del sistema nervoso prima e dopo la ozono- terapia

CTCAE/CTC	prima dell' ozono terapia	dopo ozono-terapia
Iponatremia	grade 3 <130–120 mmol/l	grado 0
Disturbi Cognitivi	grade 2 (disturbi cognitive moderati)	grado 0
Disturbi della memoria	grade 2 (moderati disturdi della memoria)	grado 0
Letargia	grado 2	grado 0
Leucoencepalopatia	grado 2 moderati sintomi; focale iperintensità in T2/FLAIR, focolai iperintensi a livello della sostanza bianca periventricolare	grado 1 piccoli focolai con iperintensi a livello della sostanza bianca
Ischemia cerebrovascolare	grado 2 Segni moderati	grado 1 asintomatico

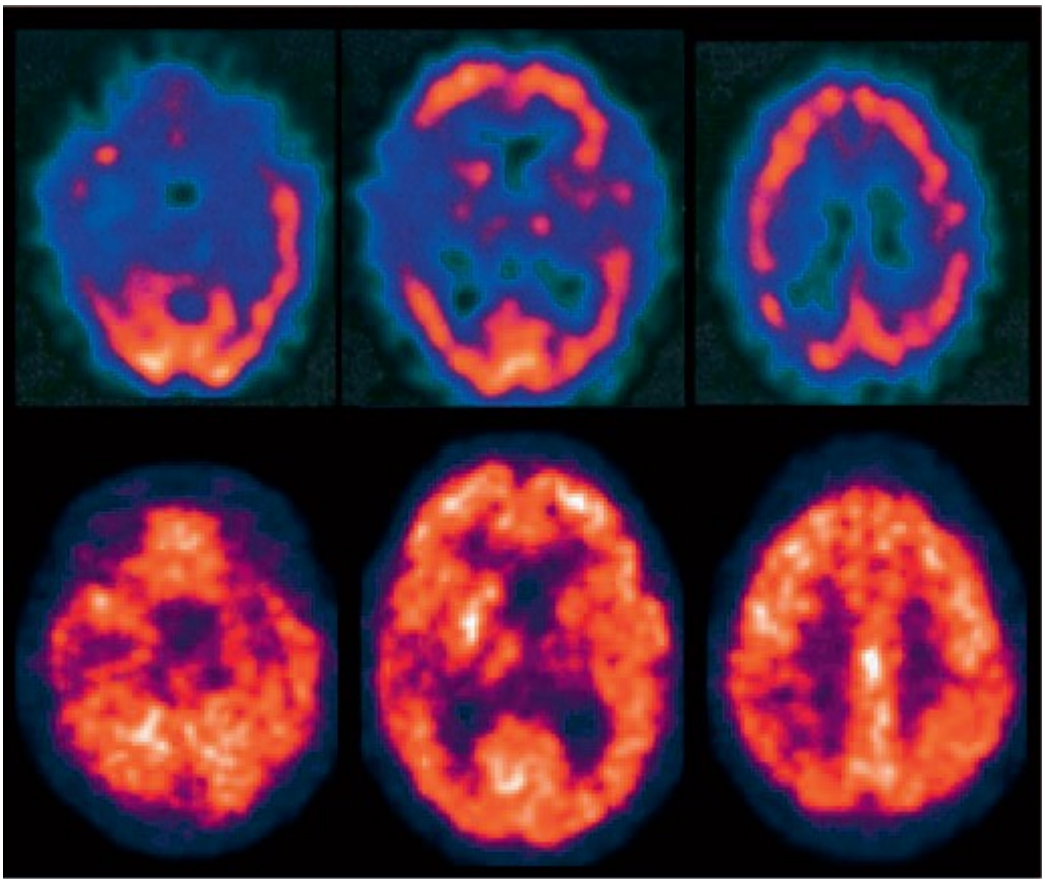


Fig. 2. Gli studi funzionali durante l'ossigeno-ozono terapia.
Pannello superiore: SPECT-ECD: a 3 mesi di trattamento si evidenzia un incremento della perfusione del sangue a livello dei lobi temporale e parietale e nei gangli della base di destra.
Pannello inferiore: PET-FDG: a 5 mesi dal trattamento con ozono , rispetto allo studio basale, si evidenzia un ulteriore aumento del metabolismo, sia nei lobi temporale e parietale di destra che a livello dei gangli della base.

Questo caso suggerisce che la terapia con l'ozono è in grado di migliorare il flusso sanguigno ed il metabolismo nelle sindromi cerebrovascolari come il TIA, l'ictus ischemico e la cerebropatia cerebrale indotta da radiazioni. I miglioramenti clinici (status fisico generale) sono perdurati per molto tempo.

In questo paziente, le potenziali diagnosi erano :

1) un processo ischemico essendo presenti i fattori di rischio, bensì in assenza di una presentazione clinica tipica; 2) cerebropatia cerebrale indotta da radiazioni, malgrado il fatto che le lesioni vasogeniche mostrate dalla RM erano presenti prima della radiochirurgia , le lesioni vasogeniche periventricolari erano distanti dalla zona limitata ,di alta irradiazione, del trattamento radio chirurgico . Probabilmene entrambi i fattori erano

implicati nelle alterazioni metaboliche osservate in questo paziente. L'esistenza di pressione alta e diabete rappresentavano fattori di rischio per malattie vascolari ed anche per RBI, allo stesso tempo l'irradiazione cerebrale incrementa il rischio di malattie cerebrovascolari e stroke .

Le opzioni terapeutiche per lo stroke, la manifestazione principale delle malattie cerebrovascolari, sono limitate. Per quanto riguarda l'aspirina, sono stati osservati dei benefici ma con un effetto limitato nel prevenire nuovi episodi , mentre il trattamento antitrombolitico con un attivatore recombinante di plasminogeno tissutale ha mostrato un effetto benefico se somministrato entro le prime 3 ore dall'episodio, ma soltanto in pazienti selezionati.

La cerebropatia vascolare indotta da radiazioni viene mediata inoltre da modifiche vascolari, infiammatorie e degenerative, compresa la demielinizzazione e la leuco-encefalopatia. Le terapie proposte con lo scopo di migliorare la perfusione/ossigenazione sanguigna comprendono gli anticoagulanti, la camera iperbarica, la stimolazione midollare e la modificazione dello status pro-ossidativo con somministrazione di vitamina E.

Nei processi ischemici e nella RBI la diminuzione del flusso sanguigno determina un apporto ridotto di ossigeno ed una riperfusione ischemica. Queste condizioni scatenano una cascata di problemi metabolici come un ridotto metabolismo aerobico del glucosio (con riduzione dei livelli ATP) ed alterazioni infiammatorie seguite da acidosi tissutale con aumento dei radicali liberi. Inoltre, l'ischemia porta ad una eccitotossicità mediata dalla attivazione dei ricettori di glutammato con un conseguente aumentato accumulo di calcio, determinando danno delle pompe di membrana ed alterazione della conduzione degli ioni con apoptosi , necrosi dei neuroni e danno della sostanza bianca.

In questo contesto, sono state riportati altri effetti interessanti della terapia con l'ozono: miglioramento della reologia vascolare , aumento di flusso nelle arterie carotide e cerebrale media, miglioramento dell'ossigenazione tissutale nei tessuti ipossici, enhancement dei sistemi antiossidanti e modulazione della risposta immune/infiammatoria. Degno di nota è il fatto che l'evoluzione clinica mostra una correlazione migliore con tecniche di imaging funzionali Pet-Spect che con la RM o la TC. La tecniche di imaging funzionale fMRI (risonanza magnetica funzionale) potrebbe essere utile per la valutazione degli effetti dell'ossigeno-ozono terapia in queste sindromi che richiedono una valutazione più ampia mediante studio clinico.

È stato studiato dagli stessi autori [41] l'effetto dell'ossigeno-ozono terapia sul flusso di sangue cerebrale a livello della arteria carotide comune e della arteria cerebrale media. In questo studio sperimentale sono stati reclutati sette volontari sani che sono trattati con ossigeno-ozono terapia tramite auto emoinfusione, cioè arricchimento di sangue autologo con una miscela di ossigeno-ozono. I soggetti sono stati sottoposti a tre trattamenti, a giorni alterni nell'arco di una settimana . E' stato studiato Il flusso di sangue dell' arteria carotide comune con il color-doppler ed è stata quantificata la velocità sistolica e diastolica dell'arteria cerebrale media mediante doppler trans-cranico. I risultati hanno evidenziato che il flusso sanguigno dell' arteria carotide comune era aumentato del 75% dopo la 3 ° sessione di ozono terapia e del 29% una settimana dopo .Nell'arteria cerebrale media la velocità sistolica è aumentata del 22% dopo la 3 ° sessione e del 14% una settimana dopo , mentre la velocità diastolica è aumentata del 33% dopo la 3 ° sessione e del 18% un settimana dopo. Questa differenza di valori del flusso cerebrale supportano le valutazioni cliniche di miglioramento, nei pazienti trattati con ossigeno-ozono terapia, affetti da cerebropatia cerebrale multinfartuale, TIA e pregresse ischemie cerebrali.

In base alla nostra esperienza clinica di miglioramento delle condizioni neurologiche di tutti i nostri pazienti trattati con somministrazione di ossigeno ozono per via sistemica tramite grande emo-infusione o insufflazione rettale, e alla letteratura internazionale in merito,

di cui abbiamo riportato i due validissimi lavori del Prof. Bernardino Clavo, Università delle Canarie, abbiamo iniziato uno studio per valutare l'aumento della ossigenazione cerebrale con la spettroscopia vicino all'infrarosso NIRS e il miglioramento del flusso cerebrale mediante doppler trans-cranico in pazienti e soggetti sani sottoposti a GAE.

Materiali e metodi: NIRS – doppler transcranico

In base alla nostra esperienza clinica di miglioramento delle condizioni neurologiche di tutti i nostri pazienti, come precedentemente riportato nella discussione, trattati con somministrazione di ossigeno ozono per via sistemica , abbiamo iniziato uno studio per valutare l'aumento della ossigenazione cerebrale con la spettroscopia vicino all'infrarosso NIRS [1,6,69,70,71,72,73,74,75,76,77] e il miglioramento del flusso cerebrale mediante doppler trans-cranico in pazienti e soggetti sani sottoposti a GAE.

La spettroscopia NIRS permette di misurare lo stato di ossigenazione dei tessuti biologici in tempo reale ed in modo assolutamente non invasivo.

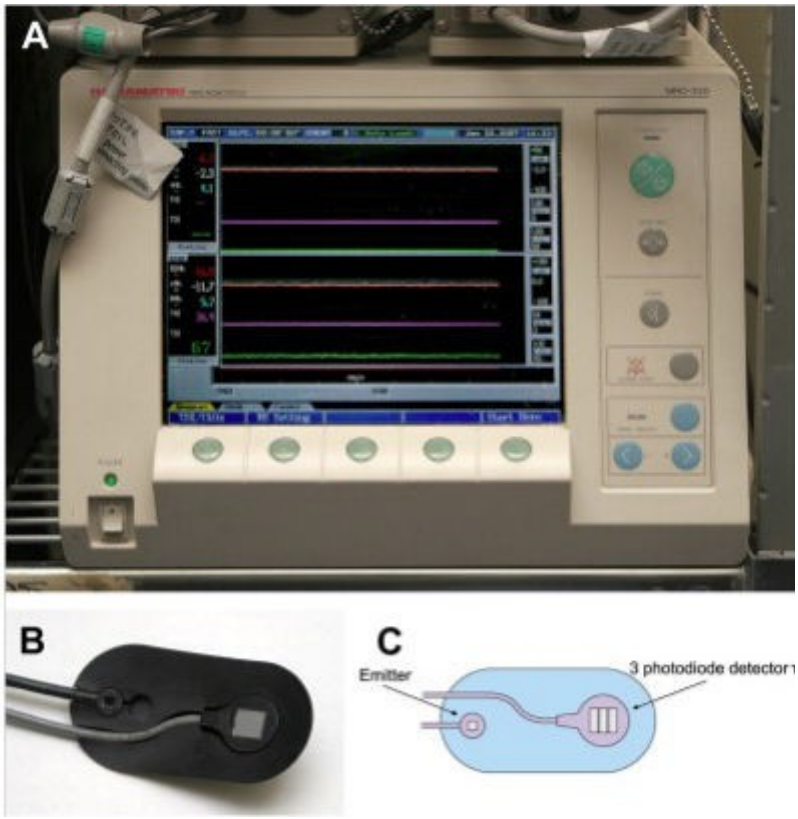


Figura 1.4: Lo spettroscopio utilizzato in questo studio, il Niro 300 (A). In B e C immagine e schema della sonda

La spettroscopia nel vicino infrarosso (NIRS – Near InfraRed Spectroscopy), una tecnica ottica che, sfruttando i diversi spettri di assorbimento delle principali molecole presenti nei tessuti, è in grado di misurare le concentrazioni di emoglobina associata all'ossigeno (HbO2) e di emoglobina non associata all'ossigeno (Hb) dalle quali è possibile estrarre l'informazione di ossigenazione.

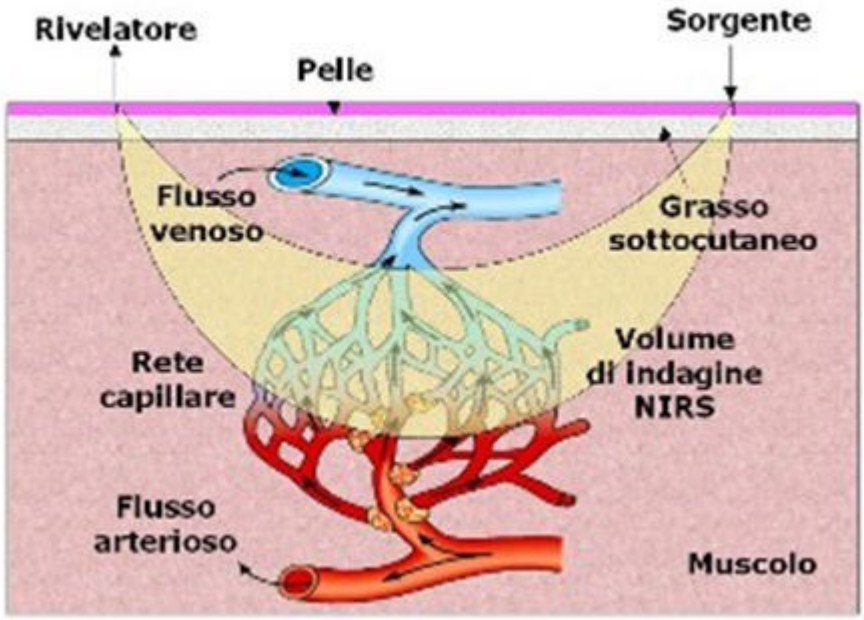
Da queste grandezze, le concentrazioni di emoglobina associata all'ossigeno (HbO2) e di emoglobina non associata all'ossigeno (Hb), è possibile ricavare due ulteriori parametri: la concentrazione di emoglobina totale (tHb) che è data dalla somma delle due concentrazioni e l'indice percentuale di ossigenazione del tessuto (TOI, Tissue Oxigenation Index) che è dato dalla formula:

$$T01 = 100 \frac{C\,[Hb\ 02]}{C\,[Hb\ 02] + c\ \ [HHb\ 02]}\ [\ \%\ ]$$

I campi di applicazione principali riportati in letteratura sono possono essere riassunti in:

- Studio del metabolismo muscolare mediante protocolli di occlusione
- Studio del consumo di ossigeno in medicina dello sport
- Studio dell'emodinamica cerebrale:
    - Monitoraggio continuativo dell'ossigenazione cerebrale
    - Valutazione funzionale cerebrale

La spettroscopia NIRS sfrutta la luce appartenente allo spettro del vicino infrarosso (Near InfraRed) che è quella porzione dello spettro elettromagnetico che va dai 650 nm ai 1000 nm. I fotoni appartenenti alla luce NIRS penetrano nei tessuti in esame e subiscono due fenomeni: l'assorbimento e lo scattering (o diffusione). L'assorbimento dei fotoni che attraversano il tessuto ha come risultato un'attenuazione del segnale ottico che è proporzionale alla concentrazione delle molecole assorbenti. Lo scattering è rappresentato dalla deviazione casuale che i fotoni subiscono a causa dei salti di indice di rifrazione durante il loro tragitto all'interno dei tessuti. Ciò si traduce in un aumento del percorso ottico seguito e quindi in un aumento dell'attenuazione subita dal segnale luminoso. Inoltre, proprio grazie a questo “sparpagliamento” del segnale, il percorso seguito dai fotoni all'interno del tessuto assume una forma a banana (banana-shape in inglese) e, fuoriuscendo essi dallo stesso lato di iniezione del segnale, è possibile tramite la sonda ottica effettuare una misura in riflettanza ossia una misura dell'attenuazione del segnale retro-diffuso.



MIGLIORAMENTO DELL'OSSIGENAZIONE CEREBRALE DOPO OZONOTERAPIA

ESAME EFFETTUATO CON APPARECCHIO NIMO PER OSSIMETRIA TISSUTALE

Ozonizzatore ad alta precisione Multiossigen PM95

Il primo test di valutazione dell'ossigenazione cerebrale mediante l'utilizzo della spettroscopia NIRS è stato da noi effettuato presso la sede della SIOOT , Bergamo, il 16 Luglio 2011 (Prof. Marianno Franzini, Prof. Vincenzo Simonetti, Prof. Francesco Vaiano, Prof. Luigi Valdenassi, Prof. William Liboni e Dott. Sergio Pandolfi) ha evidenziato un miglioramento dell'ossigenazione cerebrale dopo ossigeno-ozonoterapia tramite GAE.

L'interpretazione del test ha evidenziato che:

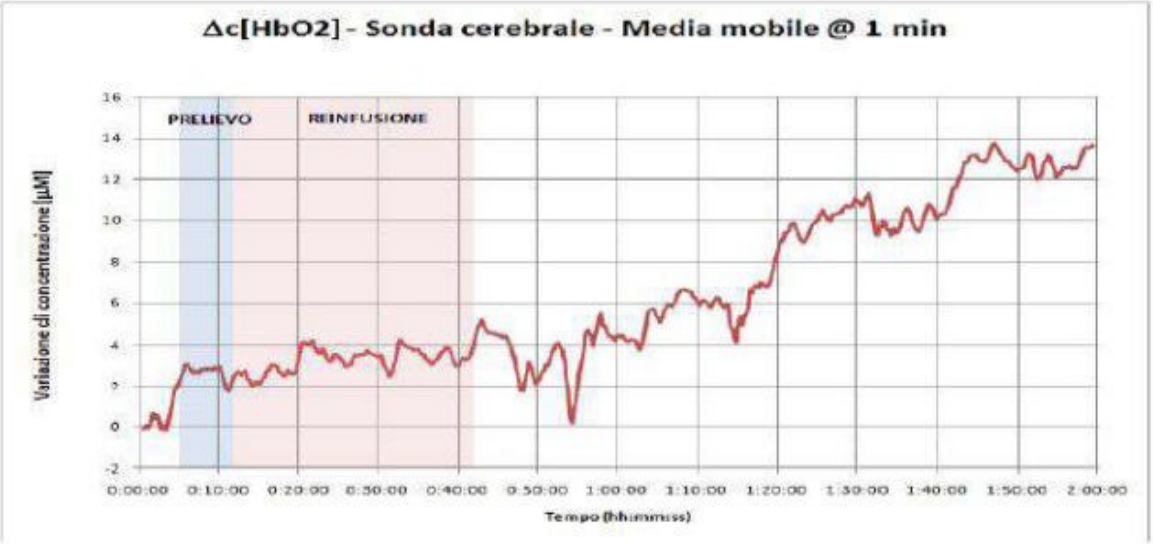
a) In seguito al trattamento con ozono si nota un aumento significativo della concentrazione di emoglobina ossigenata

b) L'effetto è riscontrabile dopo almeno un'ora dall'inizio del trattamento

c) Contemporaneamente l'emoglobina non ossigenata rimane pressoché costante indicando così un aumento dell'ossigenazione cerebrale a parità di consumo di ossigeno

TEST #2 – GORLE – 13/07/2011

PARAMETRO	DESCRIZIONE
Paziente	DONNA, ETA' ____/_____, PESO ____/_____
Posizione sonda cerebrale	Zona frontale dx
Posizione sonda muscolare	Tibiale anteriore dx
S/N Strumento	N018
Trattamento	Prelievo e re infusione in seguito a trattamento con ozono
Protocollo seguito	
00:01:00 – 00:01:20	Test di apnea
00:05:00 – 00:11:37	Prelievo di sangue _____ mg
00:11:37 – 00:42:00	Reinfusione
00:42:00 – 01:57:00	Monitoraggio
01:57:00 – 01:57:24	Test di apnea
01:59:00 – 01:59:24	Test di apnea



Successivamente son stati reclutati 9 pazienti e sottoposti a prelievo e re-infusione di sangue addizionato con ozono ed è stato valutato l'aumento della ossigenazione cerebrale mediante lo spettroscopio NIMO, a spettroscopia NIRS. I dati ricavati sono stati elaborati dall'Ing. Donnini.

Le prime sei registrazioni sono state effettuate presso lo studio del Prof. V. Simonetti a Torino mentre le ultime tre si sono svolte presso lo studio del Prof. M. Franzini a Gorle (BG).

Osservando i 9 tracciati si può suggerire la seguente interpretazione, che conferma quanto evidenziato nel test preliminare (Fig. A- Fig.B- Fig.C) :

- A livello cerebrale si nota nella maggioranza dei casi una iniziale diminuzione della concentrazione di emoglobina ossigenata dovuta al prelievo e ad un suo successivo aumento che può iniziare durante la fase di reinfusione ma che in genere si manifesta con più decisione nelle due ore successive.
- A ciò si aggiunge una sostanziale invariabilità della concentrazione di emoglobina non ossigenata con un aumento di ossigenazione del tessuto cerebrale accompagnato anche ad un aumento dell'afflusso di sangue.

Fig. A Paziente 1 **Paziente 2** **Paziente 3**

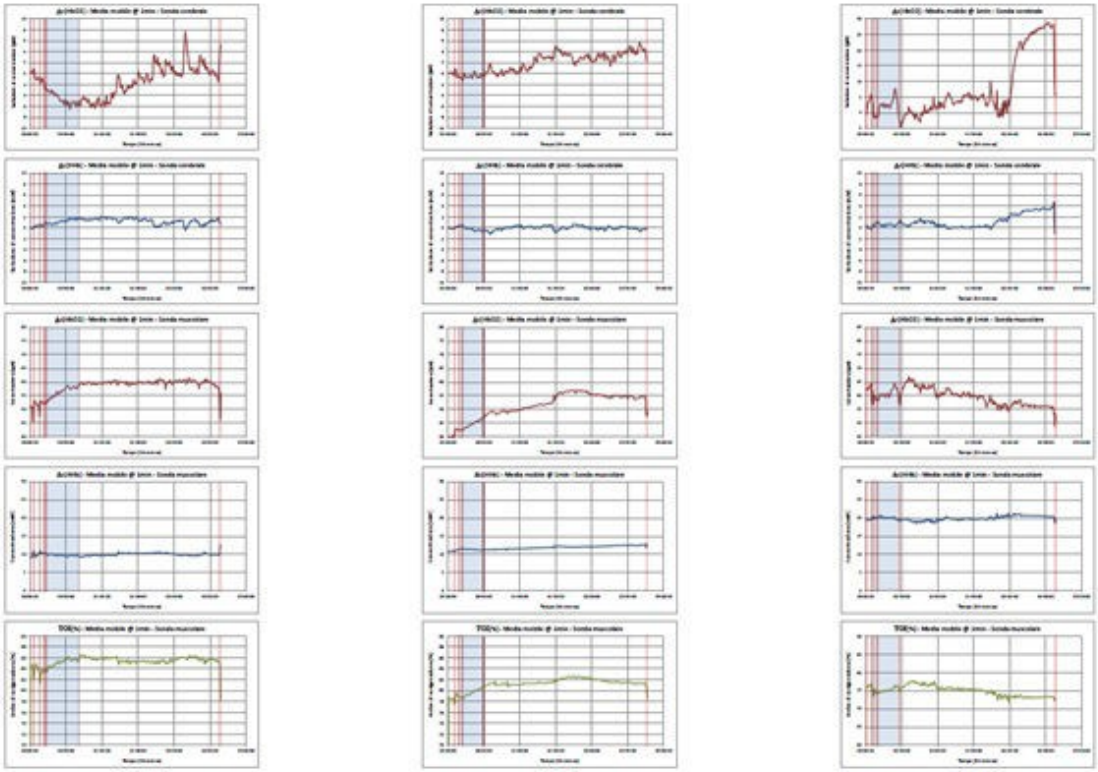
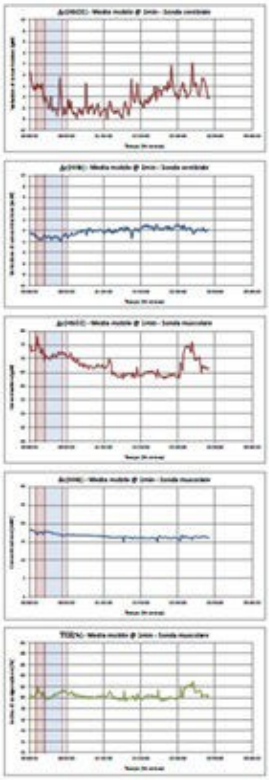
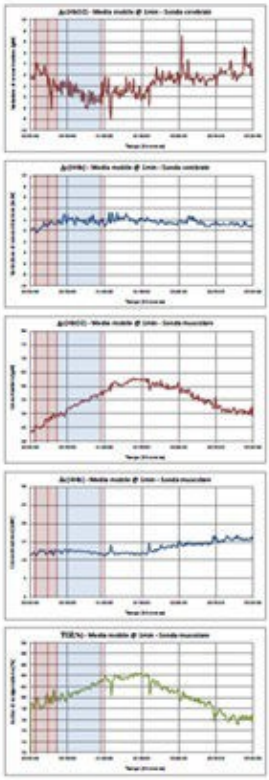


Fig.B Paziente 4



Paziente 5



Paziente 6

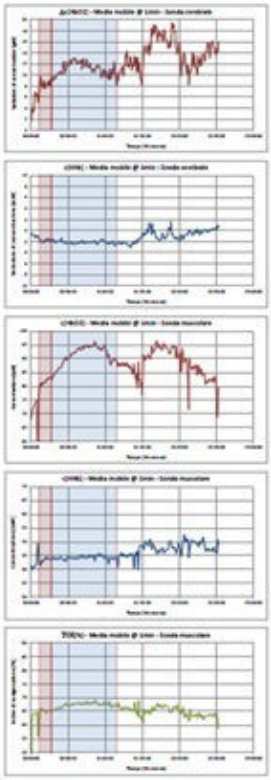
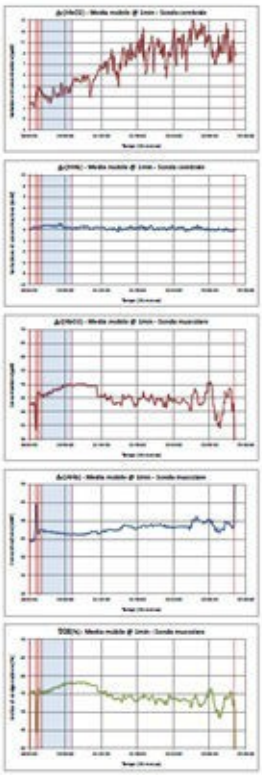
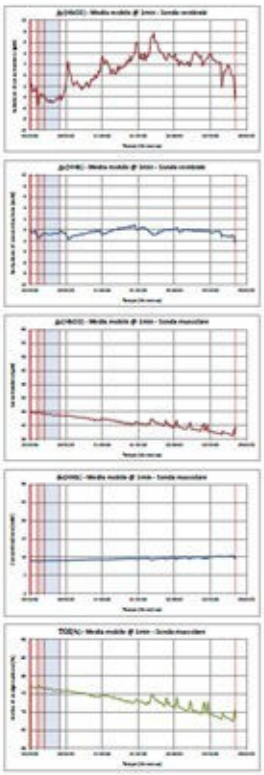


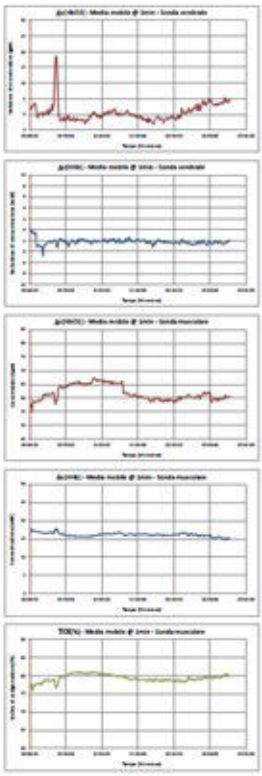
Fig. C Paziente 7



Paziente 8



Paziente 9



Alla luce di queste evidenze abbiamo proseguito la sperimentazione in collaborazione con il Dipartimento di Bio-Ingegneria del Politecnico di Torino diretto dal Prof. Molinari per valutare l'aumento dell'ossigenazione cerebrale con lo spettroscopio a tecnologia NIRS e il flusso cerebrale mediante doppler trans cranico . I primi dati, raccolti da 18 soggetti sottoposti al test, evidenziano contestualmente all'aumento della cessione di ossigeno un aumento del flusso cerebrale a livello della arteria cerebrale media .

Lo studio in corso ha coinvolto , per ora , 18 persone, di cui 6 uomini e 12 donne, sia affetti da malattie cerebrali che in buona salute.

In Tabella 2.1 è possibile vedere il dettaglio dei pazienti trattati: vengono riportati per ognuno di essi l'età, il sesso e lo stato di salute.

Alcuni dei pazienti sono stati sottoposti a più di una seduta, per un totale di 21 sedute effettuate. In particolare, il paziente 6 ha effettuato tre sedute, mentre il paziente 14 ne ha effettuate due. In questo modo, delle 21 osservazioni a disposizione, 12 riguardano pazienti donne e 9 pazienti uomini.

I pazienti sono stati selezionati dal Prof. L. Liboni e dal Prof. V. Simonetti.

Prima di essere sottoposti alla terapia, tutti i pazienti sono stati accuratamente informati sulle modalità, lo scopo ed i rischi associati all'esame che stavano per affrontare. É stato fatto loro firmare un consenso informato,riportato in Appendice A.

Tabella 2.1

	Età	Sesso	Stato di salute
Paziente 1	64	F	Buona salute
Paziente 2	69	F	Buona salute
Paziente 3	71	M	Buona salute
Paziente 4	69	F	Buona salute
Paziente 5	67	M	Buona salute
Paziente 6	33	M	Sclerosi Multipla
Paziente 7	40	F	Sclerosi Multipla
Paziente 8	33	F	Affaticamento cronico
Paziente 9	38	F	
Paziente 10	51	F	Sclerosi Multipla
Paziente 11	34	F	Malattia autoimmune
Paziente 12	62	F	
Paziente 13	64	M	
Paziente 14	40	M	Sclerosi Multipla
Paziente 15	53	F	Sclerosi Multipla
Paziente 16	50	F	Ipertensione
Paziente 17	73	F	Buona salute
Paziente 18	69	M	Idrocefalo normoteso

Tutte le sedute sono state svolte presso lo studio medico del Prof. V.Simonetti, sito in Torino (TO).

La prima fase dell'esame prevede la preparazione del paziente, che viene fatto distendere su di un lettino da visita in posizione supina. Dal momento che la durata dell'esame è di circa tre ore, sul lettino viene posto un materasso in gommapiuma e si chiede al soggetto di cercare la posizione più comoda: in questo modo si cercano di limitare fastidi e dolori dovuti alle posizioni che porterebbero il paziente a muoversi, causando errori ed artefatti nelle misurazioni.

I parametri misurati nel corso degli esami sono numerosi e, per fare ciò, vengono utilizzati diversi strumenti. Per prima cosa viene posizionata la sonda dello spettroscopio NIRS, tramite una pellicola biadesiva, sul lobo frontale sinistro dei soggetti, a circa 2 cm dalla linea mediale e circa 3 cm sopra la linea sovra orbitale. Questo posizionamento permette di evitare zone scarsamente irrorate dal flusso sanguigno come i seni paranasali. La scelta del lato sinistro è dovuta all'ipotesi di trattare prevalentemente pazienti destri, nei quali cioè l'emisfero sinistro sia quello predominante.

Nel posizionare la sonda bisogna fare attenzione a capelli, trucco o impurità presenti sulla pelle che, andando ad interagire con i fasci luminosi, falserebbero la misura. Per questo motivo, prima di applicare la sonda, si deterge la zona con un batuffolo di cotone imbevuto di alcool.

Successivamente, sul capo del paziente viene posizionato un caschetto che servirà a mantenere in posizione le due sonde del TCD (Figura 2.1).

Figura 2.1: Immagine del caschetto e delle sonde TCD fissate ad esso.

Il posizionamento di queste sonde è un passaggio delicato, che può richiedere diversi minuti, in quanto è necessario trovare la posizione e l'orientazione ottimali delle due sonde, tale da ricevere un segnale adeguato. Inoltre, come già detto, non sempre le finestre

acustiche hanno una conformazione tale da permettere di ottenere il segnale desiderato. Un'ulteriore difficoltà è data dal fatto che il caschetto va posizionato proprio sopra la sonda NIRS, che ha uno spessore di circa 2cm: ciò causa una asimmetria che non permette di tenere le due sonde TCD nella stessa posizione rispetto al capo del paziente.

L'interfaccia del dispositivo doppler utilizzato permette di visualizzare per ogni lato due segnali, relativi a due profondità diverse. In fase di setting si cerca quindi la coppia di valori che permetta di avere due segnali chiari e nitidi. Solitamente questo viene fatto su uno dei due lati, cioè su quello che dà un segnale peggiore, poi le stesse profondità vengono impostate anche per l'altro lato, cercando poi la posizione della sonda che assicuri un buon segnale con quei parametri anche su quel lato.

Figura 2.2: Pulsossimetro da dito

Gli ultimi due strumenti che si utilizzano sono un pulsossimetro (Figura 2.2) ed uno sfigmomanometro digitale (Figura 2.3): quest'ultimo permette di monitorare la pressione arteriosa sistolica e diastolica, nonché la frequenza cardiaca, mentre il primo permette di misurare la saturazione d'ossigeno periferica.

Figura 2.3: Misuratore digitale di pressione da braccio

Il NIRS ed il TCD sono dotati di interfacce che permettono, tramite due laptop, di effettuare un monitoraggio continuo durante tutta la durata dell'esame, senza interruzioni, memorizzando automaticamente i dati con frequenza pari alla frequenza di campionamento. Questi due ultimi strumenti, invece, non offrono questa possibilità e quindi è necessario avviare la misurazione ed annotare manualmente i valori ottenuti. Questa operazione è stata effettuata ad intervalli di circa venti minuti.

In Figura 2.4 e Figura 2.5 sono riportate due immagini del setup completo del paziente. Nella prima immagine è messo in evidenza l'insieme di sonde e strumenti presenti sul paziente, mentre nella seconda immagine è possibile vedere anche i due laptop con le interfacce delle spettroscopio e del doppler, nonché il NIRS stesso.

Figura 2.4: Esempio di setup completo del paziente

Una volta che il paziente è pronto viene spenta la luce nella stanza in modo da minimizzare l'interferenza con la sonda NIRS e viene inizializzato lo spettroscopio, cioè vengono calcolati i valori del punto di zero di tutte le grandezze misurate. Ovviamente è importante che l'inizializzazione dello spettroscopio avvenga dopo che la luce sia stata spenta in quanto, nonostante si cerchi di isolare le sonde dalla luce esterna, c'è sempre una certa interferenza.

A questo punto vengono avviate tutte le acquisizioni ed ha inizio l'esame vero e proprio.

I primi dieci minuti sono dedicati alla registrazione delle condizioni basali del paziente, che quindi deve essere disteso sul lettino senza stimoli esterni; la stanza deve restare il più possibile buia e silenziosa. Questo resta vero per tutta la durata dell'esame, compatibilmente con le procedure necessarie per le registrazioni dei dati.

Dopo questa fase iniziale, si chiede al paziente di effettuare tre respiri profondi e quindi di trattenere il respiro per più tempo possibile (apnea volontaria). L'inizio e la fine dell'apnea vengono annotate sui tracciati NIRS e TCD tramite dei markers che le due interfacce permettono di registrare, e con i quali è possibile rintracciare agevolmente un evento in fase di analisi.

Figura 2.4: Esempio di setup completo del paziente.

Figura 2.5: Esempio di setup completo del paziente. Sulla sinistra sono presenti i due laptop utilizzati per le acquisizioni TCD e NIRS.

Vengono valutate le condizioni basali del circolo cerebrale e le modificazioni indotte dal Breath-Holding Test in quanto si ritiene che le modificazioni del livello di CO2 ematica indotte dall'attività respiratoria siano indice della capacità autoregolatoria del microcircolo cerebrale. Lo studio si ripropone di avere una documentazione omogenea in popolazione di età compresa tra 25 e 70 anni che possa fornire dati di riferimento fisiologici ed essere popolazione di confronto per la valutazione dei rilievi su soggetti in condizioni pato-fisiologiche del circolo cerebrale indagato con la stessa metodologia e con la stessa analisi dei dati ottenuti usando metodiche e strumentazione ultrasonora.

L'utilizzo dell'ozono trova come fondamento la capacità di indurre modificazioni dei livelli ematici e tissutali di CO2. Le modificazioni nella risposta autoregolatoria del circolo cerebrale nella popolazione sana forniscono i valori normali di riferimento utili a definire le alterazioni patologiche.

Il paziente viene fatto riposare per circa due minuti in modo che tutti i parametri si riassestino dopo lo stress causato dall'apnea.

Successivamente viene accesa la luce per permettere di iniziare il prelievo di sangue. Dal momento che il cambiamento di luminosità nell'ambiente può causare interferenze con il segnale registrato dal NIRS, anche per questo evento viene posto un marker sul tracciato.

La sacca in cui il sangue fluisce una volta prelevato viene posta su una bilancia in modo da tenere sotto controllo la quantità presente. Come è già stato detto nel capitolo introduttivo, infatti, gli effetti dell'ozono dipendono strettamente dal dosaggio. Inoltre, affinché i dati provenienti dai diversi pazienti possano essere confrontabili, è necessario utilizzare gli stessi dosaggi in tutte le sedute. É quindi fondamentale prelevare sempre la stessa quantità di sangue e miscelarla ad una quantità ben precisa di miscela ossigeno/ozono.

In questo studio, è stato adottato il seguente protocollo:

- vengono prelevati 180 ml di sangue venoso;
- viene preparata una miscela O2/O3 in cui la frazione di O3 è di 40 µgr/ml;
- vengono insufflati nella sacca 180 ml di miscela, attraverso tre siringhe da 60 ml ciascuna.

Dopo ogni iniezione di ozono, la sacca viene delicatamente agitata in modo da facilitare il mescolamento tra sangue e miscela. Si nota istantaneamente il cambiamento di colore del sangue: dal rosso scuro del sangue venoso si passa al rosso vivo tipico del sangue ossigenato.

A questo punto viene rimosso il laccio emostatico e viene spenta la luce e si dà inizio alla reinfusione. Affinché questa avvenga è necessario sollevare la sacca sopra il livello del braccio, in modo che il sangue possa entrare nella vena, in accordo con il principio dei vasi comunicanti.

Per evitare che il sangue coaguli, la sacca deve essere movimentata più volte nel corso della reinfusione, ad esempio ruotandola in diverse direzioni.

Un parametro importante in questa fase è la velocità di reinfusione, ovvero quanto sangue viene reinfuso nell'unità di tempo. Essa deve essere mantenuta il più possibile costante sia nel corso della reinfusione del singolo paziente che nelle diverse sedute, in modo che i dati delle varie acquisizioni siano confrontabili tra loro. Un ingresso di sangue ozonizzato troppo rapido può inoltre causare fastidi nel paziente, tipicamente sotto forma di formicolii alle labbra.

La velocità di reinfusione dipende dalle caratteristiche reologiche del sangue, rendendo la durata di questa fase molto variabile da paziente a paziente, ma anche dall'altezza a cui è posta la sacca e da quanto sangue essa contiene. Infatti, man mano che la quantità di fluido diminuisce, si nota un rallentamento nel passaggio del sangue dalla sacca al deflussore, dovuto al fatto che la quantità di sangue è diminuita e non può più esercitare la stessa pressione sul sangue sottostante. Quando la velocità diminuisce troppo o, addirittura, si azzera, è necessario porre la sacca ad un'altezza maggiore.

Questa operazione viene effettuata più volte, rendendo necessario un attento monitoraggio di questa variabile.

Quando il sangue nella sacca è completamente defluito nel paziente, viene rimosso l'ago e la reinfusione si considera conclusa.

Da questo momento inizia una finestra di monitoraggio di circa 90 minuti, in cui il paziente viene lasciato a riposo e si continuano a registrare i segnali. Al termine di questo periodo, al paziente viene chiesto di effettuare nuovamente un' apnea volontaria. Dopo circa 10 minuti di riposo, tutte le acquisizioni vengono interrotte e l'esame è concluso.

Tabella 2.2: Procedure dell'esame

1 Inizio apnea

2 Fine apnea

3 Accensione luce

4 Inserimento ago

5 Inizio prelievo

6 Inizio ozonizzazione

7 Inizio reinfusione

8 Fine reinfusione

9 Inizio apnea

10 Fine apnea

Nella Tabella 2.2 sono riportati tutti gli eventi che, in condizioni di svolgimento standard dell'esame, vengono marcati utilizzando l'interfaccia del NIRO 300. In aggiunta a questi possono essere riportati altri eventi particolari che, in qualsiasi modo, possono influenzare il tracciato e di cui bisogna tenere conto nel corso dell'elaborazione dei segnali. Il giorno successivo a quello dell'esame viene effettuata una seduta di controllo della durata di circa

trenta minuti. La fase di preparazione del paziente è molto simile a quella del giorno precedente, in quanto gli strumenti utilizzati sono gli stessi.

La seduta prevede la registrazione delle mere condizioni basali, interrotte dall'effettuazione di due apnee volontarie a distanza di circa dieci minuti.

In un esame di lunga durata e con molti strumenti da gestire contemporaneamente come quello ora descritto possono presentarsi diverse problematiche che ne possono minare la riuscita e la validità.

Bisogna quindi prestare attenzione a tutte le fasi dell'esame, fin dal posizionamento degli strumenti. Ad esempio, particolarmente critico risulta il posizionamento del caschetto per le sonde TCD, in quanto la cinghia posteriore potrebbe dare dolore al paziente nel corso della seduta. Inoltre la parte anteriore del caschetto poggia sulla sonda NIRS, andando a creare una pressione maggiore in quella zona e quindi aumentando la probabilità di fastidi.

Il comfort del paziente è un presupposto irrinunciabile, in quanto anche piccoli fastidi con il passare dei minuti possono diventare sempre meno sopportabili e portano il paziente a parlare e/o muoversi. Entrambe queste azioni costituiscono dei disturbi nella registrazione del segnale.

Nei casi in cui il paziente dimostra di non riuscire più a restare fermo, diventa necessario muovere e spostare il caschetto, andando ad interferire sia con le due sonde TCD che con quella NIRS. Una volta trovato un nuovo assetto per il caschetto bisogna poi riposizionare le sonde TCD in quanto non si troveranno più in corrispondenza delle finestre acustiche. Questi eventi vanno annotati e queste porzioni di segnale non possono essere considerate attendibili.

Come descritto nel Capitolo 1, i valori registrati dallo spettroscopio non sono dei valori assoluti, ma sono le variazioni di queste grandezze rispetto ad un istante preso come riferimento. É quindi evidente che interrompendo l'acquisizione e riprendendola in un secondo momento, i due spezzoni di segnale non sono più confrontabili in termini di valori temporali. Spesso però i pazienti, soprattutto quelli anziani o patologici, iniziano a sentire lo stimolo della minzione durante la seduta. In diversi casi è stato necessario interrompere le acquisizioni per permettere al paziente di andare in bagno.

Oltre al fatto che l'acquisizione viene interrotta rendendo non confrontabili i due spezzoni di segnale, bisogna tenere conto del fatto che il soggetto ha eliminato dei liquidi, andando a modificare il bilancio dei fluidi all'interno del proprio organismo.

Nel caso in cui il paziente debba interrompere l'acquisizione quando è nella fase di reinfusione le problematiche aumentano, in quanto è possibile che negli spostamenti l'ago esca fuori dalla vena e si renda necessario sostituire il deflussore, interrompendo la reinfusione.

Altri eventi che possono agire come disturbi nel segnale sono eventuali attacchi di tosse o apnee nel sonno, che portano una momentanea diminuzione di apporto di ossigeno al cervello. A volte si notano anche variazioni rapide nei valori misurati dallo spettroscopio riconducibili a fattori emozionali.

In conclusione si può affermare che possono esserci molti fattori che concorrono a rendere complessa e delicata l'elaborazione e l'interpretazione di questi segnali.

Una volta completate le acquisizioni, è necessario procedere all'elaborazione dei dati ottenuti. Per ogni paziente si dispone di due brani di segnale, uno relativo al giorno della terapia ed uno relativo al giorno del controllo. La durata del segnale 'terapia' è molto variabile, mentre quello del 'controllo' si aggira intorno ai trenta minuti. La durata complessiva varia tra le tre e le quattro ore.

Per poter analizzare in modo più agevole e standardizzato i segnali dei vari pazienti, sono state considerate delle finestre temporali all'interno del segnale stesso e sono stati estratti dei parametri esclusivamente all'interno di queste finestre.

Ogni finestra avrà una durata di 256 s (cfr. paragrafo 2.5.2) e verrà centrata sull'evento di riferimento. Ad esempio, la finestra relativa alla reinfusione sarà centrata a metà della stessa, indipendentemente dalla sua durata, mentrela finestra di fine esame sarà centrata tra la fine dell'ultima apnea e la fine dell'esame.

In questo modo per ogni paziente si hanno a disposizione lo stesso numero di finestre (8+2), tutte della stessa durata, dalle quali si possono estrapolare parametri di interesse.

Le variabili che sono state oggetto di analisi sono:

- Emoglobina ossigenata, O2Hb
- Emoglobina deossigenata, HHb
- Citocromo c ossidasi, CtOx (indice di attivazione metabolica cellulare mitocondriale)
- Indice di ossigenazione tissutale, TOI

Le elaborazioni dei dati preliminari si evidenzia un aumento dell'emoglobina ossigenata a carico dei lobi cerebrali ed un aumento di flusso a livello cerebrale media a distanza di un'ora dalla reinfusione e tale incremento di flusso a livello della carebrale media è risultato persistere dopo 24 ore.

Conclusioni

Dai dati evidenziati dallo studio di questi primi 18 pazienti arruolati nella sperimentazione che è in corso, viene confermato l'aumento del flusso e dell'ossigenzione cerebrale nei pazienti sottoposti a GAE, l'aumento di flusso a livello dell'arteria cerebrale media e dell'ossigenazione cerbrale si evidenzia a distanza di 2 ore dalla reinfusione e persiste dopo 24 ore in base al successivo controllo con spettroscopio NIRS e doppler transcranico.

In fururo si propone uno studio clinico multicentrico e sperimentale per valutare:

- degli effetti dell'ossigeno ozonoterapia in ambulatorio dei pazienti affetti da cerebropatia vascolare multinfartual, monitoraggio clinico e strumentale con MRI cerebrale e neuroimaging funzionale (PWI, fRMI, PET , SPECT), test neuropsicologici.
- degli effetti dell'ossigeno ozonoterapia in ambulatorio dei pazienti affetti da idrocefalo normoteso, monitoraggio clinico e strumentale con TC, MRI cerebrale PWI, neuroimaging funzionale (PWI, fRMI, PET , SPECT), test neuropsicologici.
- degli effetti dell'ossigeno ozonoterapia in ambulatorio dei pazienti affetti da attacchi ischemici transitori TIA. e monitoraggio clinico e strumentale con MRI cerebrale neuroimaging funzionale (PWI ,fRMI DWI, PET, SPECT), test neuropsicologici.
- Valutazione degli effetti dell'ossigeno ozonoterapia in ambulatorio dei pazienti con pregresso ictus ischemico, danni ischemici da radioterapia, monitoraggio clinico e strumentale con MRI cerebrale neuroimaging funzionale (PWI, fRMI, PET , SPECT), test neuropsicologici.
- Somministrazione di miscela O3-O2 nella fase acuta dell'ictus ischemico su cavie, per valutare gli effetti dell'ozono su ischemia/riperfusione cerebrale
- Applicazione dell'ozonoterapia nel decorso post-operatorio dei pazienti operati per aneurisma cerebrale per contrastare il vasospasmo cerebrale mediante monitoraggio con doppler trans-cranico, Angio TC.
- Studio clinico su pazienti affetti da sclerosi multipla trattati con ozonoterapia come terapia adiuvante (Protocollo Simonetti-Liboni / SIOOT).

Appendice : Il consenso informato

Viene qui riportato il documento che è stato letto e firmato da ogni paziente in condizioni presunte di “buona salute” che si è sottoposto ad ozonoterapia nel corso di questo studio.

Luogo e data

Il/La sottoscritto/a

nato a il

Residente in prov via

n cap

che non presenta patologie acute in atto ed è in condizione di salute, dichiara di essere stato esaurientemente informato dal Pro. Simonetti delle finalità di studio osservazionale “reattività cerebro-vascolare in condizioni basali e dopo autoemoinfusione ozonizzata”.

Lo studio si ripropone di documentare con strumentazione non invasiva, facilmente trasportabile, le condizioni basali del circolo cerebrale e le modificazioni indotte dal Breath-Holding Test in quanto si ritiene che le modificazioni del livello di CO2 ematica indotte dall'attività respiratoria siano indice della capacità autoregolatoria del microcircolo cerebrale. Lo studio si ripropone di avere una documentazione omogenea in popolazione di età compresa tra 25 e 70 anni che possa fornire dati di riferimento fisiologici ed essere popolazione di confronto per la valutazione dei rilievi su soggetti in condizioni pato-fisiologiche del circolo cerebrale indagato con la stessa metodologia e con la stessa analisi dei dati ottenuti usando metodiche e strumentazione ultrasonora.

L'utilizzo dell'ozono trova come fondamento la capacità di indurre modificazioni dei livelli ematici e tissutali di CO2. Le modificazioni nella risposta autoregolatoria del circolo cerebrale nella popolazione sana forniscono i valori normali di riferimento utili a definire le alterazioni patologiche.

Numerosi studi scientifici hanno già dimostrato la non tossicità dell'ozono-terapia somministrata secondo i protocolli approvati dalla Società Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia. Sui pazienti trattati non sono stati osservati effetti collaterali, eccetto quelli dovuti alla puntura della vena (bruciore, dolore, ecchimosi, ematoma): altri eventi diversi sono da considerarsi quanto mai rari e comunque non attribuibili ad effetti tossici dell'ozono, ma a fattori emozionali. Le uniche controindicazioni note sono l'ipertiroidismo ed il deficit di glucosio-6 fosfato-deidrogenasi.

La somministrazione dell'ozono prevede: prelievo di 180 ml di sangue, come per una donazione, che dopo essere stato mescolato con una miscela di ossigeno e ozono, viene reinfuso. La metodica prevede l'uso di materiale di consumo monouso e di apparecchio generatore di ozono certificato ed approvato dai competenti organi ministeriali. La registrazione dei dati in condizioni basali viene effettuata su soggetto supino in un arco temporale di 15 minuti, contestualmente al rilievo della tensione ematica di O2 e dei parametri cardiocircolatori (pressione+FC). Il Test Breath-Holding comporta una apnea di circa 15 sec. La registrazione dopo infusione di O3 prevede il monitoraggio per circa 90 minuti. A distanza di circa 24 ore dopo la somministrazione dell'ozono verrà effettuato un ulteriore controllo basale della durata di circa 30 minuti.

Ho compreso le modalità e la finalità di tale studio osservazionale ed esprimo parere il mio consenso informato a partecipare allo stesso. Alle domande da me poste il medico ha fornito risposte comprensibili, tali da consentirmi di fare un quadro completo e del tutto esauriente del test:

SONO QUINDI IN GRADO DI DECIDERE CONSAPEVOLMENTE SUL TRATTAMENTO A CUI DOVRÒ ESSERE SOTTOPOSTO.

Dichiaro quindi di ACCONSENTIRE la partecipazione allo studio propostomi

Firma del paziente Firma del medico

Acconsento inoltre che i miei dati vengano trattati, nel rispetto della legge sulla privacy, per comunicazioni scientifiche o consulti professionali utili per la mia salute

Firma del paziente Firma del medico

Applicazione dell'ozonoterapia nella prevenzione del vasospasmo cerebrale.

Come ampiamente descritto, l'ozono può essere utilizzato in tutte le forme morbose in cui vi è un ridotto apporto di ossigeno perché ha un effetto di riattivazione del microcircolo e pertanto ha una azione protettiva multi-organo.

Induce un aumento della deformabilità eritrocitaria e della produzione del 2/3 difosfoglicerato e della P50st che determina un incremento della cessione di ossigeno ai tessuti spostando verso destra la curva di dissociazione dell'emoglobina.

A livello pre-capillare l'ozono attiva il rilascio di monossido d'azoto (NO) che determina vasodilatazione.

L'ozono ha una azione anti infiammatoria poiché determina una riduzione della produzione delle prostaglandine agendo sull'acido arachidonico ed ha una azione antiossidante attivando le funzioni protettive endogene delle cellule contro i radicali liberi.

Lo studio sperimentale in corso nei pazienti sottoposti a GAE e valutati mediante il doppler transcranico e la spettroscopia NIRSha evidenziato:

a) In seguito al trattamento con ozono si nota un aumento significativo della concentrazione di emoglobina ossigenata riscontrabile dopo almeno un'ora dall'inizio del trattamento

c) Contemporaneamente l'emoglobina non ossigenata rimane pressoché costante indicando così un aumento dell'ossigenazione cerebrale a parità di consumo di ossigeno.

d) un aumento di flusso a livello cerebrale media a distanza di un'ora dalla reinfusione e tale incremento di flusso a livello della carebrale media è risultato persistere dopo 24 ore, il flusso cerebrale può essere modulato in base alla velocità di reinfusione del sangue ozonizzato.

Si propone di valutare degli effetti della ossigeno ozono terapia, tramite auto emo-infusione (GAE), nella prevenzione del vasospasmo cerebrale, nel decorso post-operatorio di pazienti operati per aneurisma cerebrale freddo o con ESA una volta escluso l' aneurisma dal circolo mediante clippaggio.

Le possibilità terapeutiche dell'ozono in caso di danno ischemico da vasospasmo sono:

- Aumento omogeneo della cessione di O^2 nel parenchima cerebrale, del flusso ematico e del metabolismo cerebrale. [1,6,9,10,31,41,56]
- Incremento della perfusione cerebrale a livello del microcircolo cerebrale per aumentato rilascio di NO e vasodilatazione cerebrale [2,11,14,15,17,32,35,38,42,47]
- Azione antiinfiammatoria ed antiossidante dell'ozono. [11,17,26,32,39,42,50,54,57,3,13,14,15,20,22,25,26,30,44,48,62,64]

Il termine vasospasmo indica la riduzione di calibro delle arterie cerebrali dovuta alla contrazione della tunica media: interessa pertanto prevalentemente le arterie a larga capacitanza della base cranica e viene monitorizzato mediante esami doppler trans-cranico ed Angio TC.

Determina un ridotto flusso ematico nei territori delle arterie spastiche, esponendo pertanto i lobi cerebrali a rischio di insulto ischemico.

L'insorgenza del vasospasmo [101,102,103] si registra generalmente dopo 3-5 giorni dal sanguinamento, raggiunge un picco di incidenza e gravità in 7^a-8ª giornata e si può protrarre sino a 4 settimane dall'ESA. Importante è la distinzione tra "vasospasmo arterioso" che indica la riduzione del calibro vasale documentata dall'angio-TC e tramite controllo della velocità di flusso nei grossi vasi cisternali con doppler tran cranico e il "vasospasmo sintomatico" rappresentato dalla sindrome ischemica clinica ad esso correlata: solo la metà circa dei pazienti con vasospasmo angiografico (il 40-70% dei pazienti con ESA) sviluppa deficit neurologici ischemici [81].

La discordanza esistente tra l'incidenza del vasospasmo arterioso e quello sintomatico è legata alla riduzione assoluta del CBF, che dipende a sua volta dalla distribuzione e dall'entità del restringimento vasale, dalla CPP, dal livello di ematocrito e da altri fattori che influenzano l'apporto ematico collaterale, un ampio range di valori di CBF è compatibile con una funzione neurologica normale. Il CBF regionale misurato in pazienti sani varia da 50-70 ml/100mg/min. Studi clinici e sperimentali hanno dimostrato che i sintomi di ischemia cerebrale e le alterazioni elettriche corticali non si verificano finchè il CBF non raggiunge valori pari o inferiori a 20 ml/100mg/min, mentre danni strutturali irreversibili sono presenti solo quando il flusso si riduce ulteriormente a valori <15 mg/100ml/min. È quindi facile intuire come un paziente anche con vasospasmo arterioso severo possa avere un CBF

ridotto ma ancora funzionalmente valido e pertanto essere del tutto asintomatico dal punto di vista clinico [82]. In un tale paziente, ovviamente, anche minimi cambiamenti della pressione arteriosa o del volume e della viscosità del sangue possono immediatamente precipitare un quadro clinico drammatico.

Vasospamo angiografico:

Insorgenza:	3-5 giorni
Picco:	5-14 giorni
Risoluzione	2-4 settimane

Il 15-20% dei pazienti con vasospamo angiografico nonostante terapia massimale diventa sintomatico perché si instaura l' ischemia cerebrale o muore per questa complicanza.

La comparsa di manifestazioni ischemiche dipende infatti oltre che dal grado e dall'estensione del restringimento arterioso, da altri fattori quali la pressione arteriosa, la volemia, la viscosità ematica, l'ematocrito, l'instaurazione di un circolo collaterale di compenso e la perdita della fisiologica autoregolazione del flusso ematico cerebrale [83].

Quest'ultimo fenomeno si può osservare in concomitanza con il vasospasmo ma non presenta alcuna relazione di tipo causa-effetto con esso [84] .

Con la perdita della regolazione del flusso cerebrale vengono meno quei meccanismi presenti a livello del microcircolo che garantiscono una costanza del flusso ematico a fronte di variazioni della pressione arteriosa sistemica e pertanto il flusso ematico cerebrale diviene passivamente dipendente da quest'ultima esponendo il tessuto cerebrale a rischio di danno ischemico.

Una correlazione tra quantità e distribuzione del sangue subaracnoideo dimostrabile alla TC in fase acuta e incidenza di vasospasmo è stata messa a punto da Fisher [85] che osservò come la più elevata incidenza di vasospasmo sintomatico si osservava in pazienti con coaguli ematici subaracnoidei di aspetto globulare di dimensioni superiori a 3x5 mm o di strati di sangue di più di 1 mm localizzati a livello (ci sternale)

Classificazione di Fisher (1980)

- **a: assenza di sangue**
- **b: diffusa, sottile lamina di sangue < di 1mm di spessore**
- **c: lamina di sangue > di 1mm di spessore in sezione sagittale o > di 5x3 mm nelle sezioni assiali**
- **d: emorragia intraventricolare o intraparenchimale**

Il vasospasmo viene usualmente trattato dal punto di vista medico con la terapia delle cosiddette tre H, costituita da ipertensione arteriosa, ipervolemia ed emodiluizione, dall'iniezione selettiva intraarteriosa di nimodipina o dalla dilatazione meccanica mediante angioplastica dei vasi interessati dopo aver escluso dal circolo l'aneurisma rotto .

Nella genesi del vasospasmo in corso di emorragia sub-aracnoidea (ESA) giocano certamente un ruolo importante i prodotti di degradazione dell'emoglobina con la formazione di radicali liberi, le cellule muscolari lisce ed endoteliali, l'attivazione piastrinica col richiamo di cellule infiammatorie e il rilascio di acido arachidonico. Recenti studi hanno evidenziato un ruolo importante della risposta infiammatoria nello sviluppo e nel mantenimento del vasospasmo cerebrale .[86,87]

L'applicazione dell'ossigeno-ozonoterapia, tramite auto-emoinfusione nei pazienti operati mediante clippaggio dell' aneurisma cerebrale ha come obiettivo la prevenzione del vasospasmo cerebrale.

Il vasospasmo colpisce il 60-70% dei pazienti con Esa e si manifesta come una ischemia sintomatica nella metà di questi ed è dovuto alla presenza di sangue negli spazi sub-aracnoidei ma può anche manifestarsi in seguito al trattamento chirurgico o endovascolare di un aneurisma non rotto a seguito della manipolazione dei vasi arteriosi .

L'ozono ha proprietà antinfiammatorie e antiossidanti , reologiche sul microcircolo e sul metabolismo dell'emoglobina determinando una maggiore cessione di O2 ai tessuti.

Attualmente la reale influenza sul vasospasmo e sui deficit neurologici successivi al trattamento degli aneurismi cerebrali rotti e non rotti mediante procedura chirurgica, (clipping) o embolizzazione (coiling) non è stata sufficiente chiarita .

Nel nostro paese è in corso un studio multicentrico per valutare il risultato del trattamento chirurgico o endovascolare degli aneurismi rotti e non rotti presso La Neurochirurgia di Brescia, Milano, Roma , e l'Aquila. A tutto il 2011 , tra i 60 pazienti complessivamente

studiati, 28 clippati e 32 embolizzati non sono emerse differenze significative in termine di out-come (congresso di Neurochirurgia, Firenze 2011) [88] .

Uno studio della Neurochirurgia dell'Università di Messina [89] , ha documentato che il trattamento chirurgico degli aneurismi rispetto a quello endovascolare causa una maggiore incidenza di vasospasmo ma che questo non si associa ad una maggiore possibilità di comparsa di deficit neurologi post-ischemici o di mortalità .

Per emorragia subaracnoidea (ESA) si intende un sanguinamento che ha luogo negli spazi sub-aracnoidei tra l'aracnoide e la pia madre, generalmente dovuto a rottura di un aneurisma cerebrale a livello delle cisterne della base cranica ove decorrono i grossi vasi cerebrali . L'ESA può essere una conseguenza anche di un trauma cranico, in questo caso lo spandimento ematico il più delle volte si manifesta a livello della convessità cerebrale e normalmente ha una evoluzione benigna.

I sintomi di emorragia sub-aracnoidea includono la cefalea intensa a rapida insorgenza , vomito, alterazioni dello stato di coscienza, possibile perdita di coscienza e sintomi neurologici più o meno gravi.

La Scala di Hunt e Hess (1968) valuta le condizioni cliniche del paziente con ESA:

- I° : paziente asintomatico o con minima cefalea e lieve rigor nucalis
- II° :Cefalea moderata o grave, rigidità nucale, nessun deficit neurologico (esclusa la paresi dei n.c.)
- III°: Torpore, confusione o lieve deficit focale
- IV°: Stupore, emiparesi moderata o grave, possibile iniziale postura in decerebrazione e disturbi vegetativi
- V° : coma profondo, postura in decerebrazione

La diagnosi viene generalmente confermata grazie ad un esame TC e Angio-TC cerebrale che evidenziano lo spandimento ematico negli spazi sub-aracnoidei della base cranica e l'aneurisma cerebrale rotto. Nelle forme sine materia la diagnosi si effettua con la puntura lombare.

Il trattamento è open mediante clippaggio dell'aneurisma o endovascolare tramite embolizzazione.

La morbilità e la mortalità ad essa correlate restano a tutt'oggi molto elevate, nonostante i progressi della diagnostica neuroradiologica, del trattamento, chirurgico o endovascolare, e delle tecniche rianimatorie.

Le complicanze dell'emorragia sub-aracnoidea (ESA) sono rappresentate da:

- danno cerebrale acuto
- risanguinamento;
- vasospasmo e disturbi dell'autoregolazione del flusso ematico cerebrale;
- idrocefalo.
- epilessia e crisi comiziali

La prognosi del paziente con emorragia subaracnoidea da rottura di aneurisma è pesantemente condizionata dal rischio di tali complicanze che possono intervenire in fase acuta e subacuta anche in pazienti in buone condizioni, rendendosi spesso responsabili di drammatiche modificazioni del quadro clinico che necessitano di una pronta diagnosi e di adeguate strategie terapeutiche.

L'ESA va pertanto considerata un'emergenza da trattare in centri specializzati ove siano disponibili un'adeguata competenza ed un'attenta sorveglianza da parte del personale medico e paramedico, volte a riconoscere le sue manifestazioni cliniche le sue complicanze e quindi idonei ad istituire tempestivamente le appropriate misure diagnostiche e terapeutiche.

L'ESA causa un danno cerebrale ischemico acuto al momento del sanguinamento iniziale, così come avviene successivamente attraverso l'instaurazione del vasospasmo. Secondo lo Studio Cooperativo Internazionale sul “Timing” della Chirurgia aneurismatica, il vasospasmo ed il risanguinamento costituiscono le cause più importanti di morbilità e mortalità dopo ESA [90]. Tuttavia recenti studi hanno documentato come l'emorragia iniziale sia di gran lunga la determinante più importante nella prognosi dopo ESA aneurismatica [91], analogamente a quanto avviene in altre forme di ischemia cerebrale, l'evento emorragico iniziale innesca una serie di eventi che conducono ad una ipoperfusione persistente con conseguente danno neuronale ischemico.

Questa “cascata” multifattoriale si verifica in un lasso di tempo sufficientemente lungo da poter eventualmente permettere un trattamento ultraprecoce [92].

Studi autoptici in pazienti deceduti immediatamente dopo un'ESA dimostrano un esteso danno ischemico cerebrale. La precisa causa di quest'ultimo non è ben conosciuta, ma è stata ipotizzata una profonda riduzione della pressione di perfusione cerebrale (CPP) durante le fasi iniziali dell'ESA. Tale concetto è confermato da osservazioni occasionali in pazienti deceduti in seguito a risanguinamento in cui era evidente una netta riduzione della CPP. Tuttavia l'aumento della pressione intracranica (ICP) è decisamente maggiore nei casi di

risanguinamento, nei quali la compliance cerebrale è decisamente ridotta. Studi sperimentali dimostrano che in caso di ESA, la CPP si riduce, ma, nella maggior parte dei casi, non tanto da provocare un arresto di perfusione cerebrale.

Altre evidenze sperimentali non sono riuscite a dimostrare una relazione tra l'aumento della ICP o la riduzione di CPP e l'"outcome" neurologico. In pratica la riduzione della CPP non può da sola rendere conto del danno ischemico acuto da ESA [92,93] . Quest'ultima è accompagnata da una riduzione acuta del flusso ematico cerebrale (CBF) entro 10-30 minuti dopo l'emorragia, ed è associata ad una vasocostrizione del microcircolo. In media il CBF si riduce al 50-60% dei valori basali. In caso di estese emorragie sperimentalmente indotte negli animali, con mortalità a 24 h pari al 50%, i valori di CBF discendono nei primi tre minuti a valori pari al 20% dei valori basali per poi attestarsi intorno al 50% nella prima ora. La riduzione di CBF non si correla con una diminuzione del CPP [94]. Poiché CBF=CPP/R, dove per R si intendono le resistenze vascolari, ne consegue che una vasocostrizione acuta (con aumento quindi delle resistenze) gioca un ruolo fondamentale nell'ipoperfusione cerebrale immediata post-ESA. La ricerca di eventuali valori predittivi precoci dell'outcome al fine di valutare l'efficacia del trattamento ha condotto ad esaminare il legame tra riduzione di CBF e vasocostrizione acuta e mortalità precoce, correlando CBF, ICP e CPP alla mortalità a 24 ore. Sebbene i cambiamenti acuti della ICP si correlavano linearmente con la mortalità a 24 ore, il solo elemento predittivo significativo a 60 minuti è risultato il CBF. Valori <40% dei valori basali a 60 minuti si correlavano con una mortalità del 100% nelle prime 24 ore [92]. L'entità dell'emorragia è significativamente maggiore nelle ESA letali. Un ora dopo l'ESA è stata dimostrata una relazione inversamente proporzionale tra il volume dell'ESA ed il CBF ($r=0,78$, $P<0,01$), ma non con la CPP e l'ICP, e ciò ben si correla con l'osservazione clinica che pazienti con vaste emorragie sub aracnoidee hanno una evoluzione clinica peggiore.

Quanto finora esposto avvalora il concetto che una riduzione di calibro del microcircolo si verifica acutamente dopo un ESA. Tale vasocostrizione si produce indipendentemente dai cambiamenti della CPP globale e contribuisce significativamente ad un "outcome" sfavorevole. Tale vasocostrizione è causata da uno sbilanciamento tra vie metaboliche strettamente intercorrelate che da una parte inibiscono il tono vasodilatatorio basale, e dall'altra incrementano l'attività vasocostrittoria. Il tono vasodilatatorio è attenuato da una riduzione della disponibilità di NO (ossido nitrico) conseguente ad una "down-regulation"

dell'NO-sintetasi [95], così come da una ridotta attività della guanilato ciclasi, del cGMP e cAMP. La vasocostrizione, al contrario, è incrementata dall'attivazione di circuiti catecolaminergici centrali e sistemici, nonché dalla produzione e liberazione di sostanze ad elevata attività vasocostrittoria quali radicali liberi, eicosanoidi, angiotensina ed endoteline [101]. L'attivazione delle forze vasocostrittrici è aumentata dagli stessi fattori che contemporaneamente inibiscono il tono vasodilatatorio. Le strategie terapeutiche dovrebbero essere indirizzate verso tali multipli meccanismi vasocostrittori e richiedere pertanto differenti approcci farmacologici.

La nozione che l'ESA produca un aumento della ICP tale che la CPP si azzeri ("arresto di perfusione"), favorendo così la formazione di un coagulo a costo di un grave danno cerebrale, sia diffusa e comunemente accettata, ma se tutte le ESA producessero un arresto di perfusione, la perdita di coscienza al momento del sanguinamento dovrebbe essere la regola, mentre sappiamo che essa si realizza solo in una percentuale di casi oscillante tra il 30 ed il 45%. Al contrario è ragionevole ipotizzare che almeno nel 50% dei casi i cambiamenti della ICP non siano così semplicistici e che l'arresto di perfusione non spieghi da solo la formazione del coagulo e l'arresto dell'emorragia. Lo studio delle variazioni acute dopo ESA della ICP e della CPP nell'uomo sono state nella quasi totalità dei casi il risultato fortuito di osservazioni in pazienti già monitorati nel corso di un secondo o terzo sanguinamento, e non già a seguito di un primo episodio. Tali casi, con prognosi generalmente infausta, non possono essere rappresentativi di tutti i casi di ESA, a causa della pre-esistenza, al momento del sanguinamento, di coaguli a livello cisternale, di un danno cerebrale, di una ridotta compliance cerebrale, di alterate resistenze a livello del flusso liquorale ed elevati valori basali di ICP. Evidenze sperimentali su animali hanno dimostrato che nei primi cinque minuti dopo ESA l'arresto dell'emorragia e la formazione del coagulo sono favorite da una aumento localizzato della pressione a livello della cisterna contenente l'aneurisma sanguinante, piuttosto che da un aumento della pressione dell'intero compartimento intracranico [93]. In tal caso il gradiente di pressione transmurale pari approssimativamente a zero permetterebbe l'arresto dell'emorragia con la formazione del coagulo. Al momento della rottura aneurismatica il sangue diffonde rapidamente nello spazio subaracnoideo. Tale flusso (F) segue la legge di Poiseuille $F=\Delta P\pi r4$ Il gradiente di pressione (ΔP) tra la la pressione arteriosa media cerebrale e la pressione cisternale indirizza il verso del flusso, ed il raggio della breccia arteriosa innalzato alla quarta potenza

(r4) è direttamente proporzionale alla quantità del flusso. La cisterna contenente l'aneurisma si riempie di sangue ed il CSF in essa contenuto viene spiazzato nelle cisterne adiacenti mentre il CSF contenuto in queste ultime si sposta nello spazio subaracnoideo generale, con una sorta di reazione a catena, che in condizioni di compliance normale, raggiunge in breve tempo uno “steady state”. Affinché si arresti l'emorragia, è necessaria una concentrazione critica di sangue a livello cisternale, dove il CSF viene spiazzato per ottenere la formazione di un coagulo efficace. Ciò spiega perché emorragie ad alto flusso raggiungono prima le condizioni necessarie per la formazione del coagulo rispetto a quelle a basso flusso.

Nell'animale da esperimento, l'ESA si arresta durante la fase acuta sin qui descritta. Le variazioni di ICP e CPP cominciano a risolversi durante la fase subacuta (5-20 min). La risoluzione dell'ICP può non essere uniforme, rimanendo significativamente più alta in un emisfero piuttosto che nell'altro, contribuendo così a spiegare il “brain shift” ed il danno emisferico post-ESA. È dimostrato che la diminuzione nelle fasi precoci della CPP, così come il suo mancato ritorno ai valori basali, non ha nessuna correlazione con il grado clinico dell'animale da esperimento [96]. L'autoregolazione dei cambiamenti della pressione arteriosa è alterata nei primi minuti post-ESA. La velocità del suo recupero ben si correla sperimentalmente con il grado clinico, con miglior outcome per recuperi più precoci. Nell'uomo l'autoregolazione può restare alterata anche per molti giorni dopo un ESA. Anche il CBF tende a recuperare nella fase post-acuta e, come per l'autoregolazione pressoria, la velocità di recupero si correla linearmente con il grading clinico. La differenza tra CBF corticale (a rapida normalizzazione) ed il CBF della sostanza grigia profonda (a lenta normalizzazione) può spiegare il possibile danno selettivo delle strutture encefaliche profonde che si osserva in seguito ad ESA. Nel periodo post-acuto è inoltre dimostrata una fase di iperemia, non sorprendente tenuto conto dell'alterazione dell'autoregolazione pressoria. L'indice metabolico cerebrale dell'O2 (CMRO2) è notevolmente diminuito in seguito ad ESA mentre la differenza artero-venosa di O2 (AVDO2) ha un pattern variabile. In generale quei pattern di CBF, CMRO2, AVDO2 che indicano un miglioramento del flusso e del “coupling” metabolico si associano a buoni gradi clinici. In pratica, nelle fase sub-acuta, l'attività metabolica è più rappresentativa del danno e dell'outcome della caduta della CPP nella fase acuta.

Il risanguinamento rappresenta la maggiore causa di morbidità e di mortalità nella storia naturale dell'ESA da rottura di un aneurisma, poiché aumenta esponenzialmente le sue complicanze. Il più elevato rischio di risanguinamento si registra entro le ventiquattro ore dal primo sanguinamento in relazione, verosimilmente, all'instabilità del coagulo ed alla elevata pressione arteriosa sistemica. Le percentuali di risanguinamento precoce riportate da diversi studi vanno dal 4% al 9,6% [97,98] , con un picco massimo di rischio entro le 2 ore dall'evento emorragico [99]. Secondo lo studio di Hilmann 2002 il rischio di risanguinamento entro le prime 12 ore è del 15% , entro le prime 24 ore è del 17% .

Questi dati rappresentano il razionale per il trattamento chirurgico o endovascolare più precoce possibile dell'aneurisma che è responsabile dell'ESA.

Un secondo picco di incidenza di risanguinamento di minor entità si registra verso la fine della prima settimana dall'emorragia[99] in rapporto verosimilmente all'aumentata attività fibrinolitica subaracnoidea.

Il tasso di sanguinamento complessivo è compreso tra il 15 e il 25% a 15 giorni dall'ESA, di circa il 40% a 180 giorni, dopodiché il rischio si attesta intorno al 3% all'anno .

Conclusioni:

Esclusione dal circolo di aneurisma cerebrale mediante clippaggio (Foto 1,2,3,4)

Foto 1

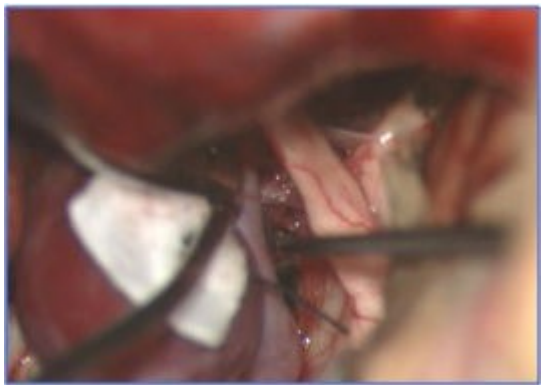


Foto 2

Foto 3

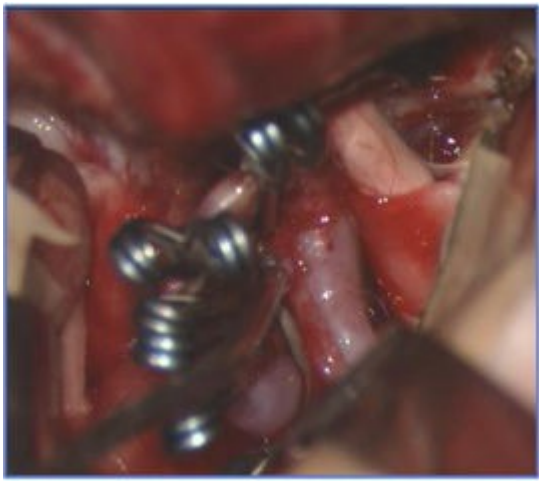


Foto 4

Si propone di trattare, con ossigeno-ozonoterapia mediante grande auto-emoinfusione, i pazienti operati di aneurisma cerebrale freddo o con Esa, (clippaggio ed esclusione della sacca aneurismatica dal circolo cerebrale) per contrastare l'insorgenza del vasospasmo post-operatorio e per neuro-protezione.

BIBLIOGRAFIA:

1. **NIRS REPORT**
Prof. Marianno Franzini, Prof. Vincenzo Simonetti, Prof. Francesco Vaiano,
Prof. Luigi Valdenassi, Dott. Sergio Pandolfi, Prof. William Liboni
Pubblicato online il 16 Luglio 2011
Società Italiana di Ossigeno e Ozono Terapia. Bergamo Italy

2. **Meccanismi d'azione dell'ozono**
Valdenassi L.
Università di Pavia – SIOOT 2012

3. **[Medical applications of ozone for the rehabilitation of the patients presenting with chronic bronchitis and arterial hypertension].**
Khmeleva EV, Vitkina TI, Antoniuk MV, Novgorodtsev AD.
Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. 2012 May-Jun;(3):3-8. Russian.

4. **Comparison of melatonin and ozone in the prevention of reperfusion injury following unilateral testicular torsion in rats.**
Ekici S, Doğan Ekici AI, Öztürk G, Benli Aksungar F, Sinanoğlu O, Turan G, Lüleci N.
Department of Urology, Maltepe University School of Medicine, Istanbul, Turkey.
Urology. 2012 Oct;80(4):899-906. doi: 10.1016/j.urology.2012.06.049. Epub 2012 Aug 28.

5. **Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease.**
Martínez-Sánchez G, Delgado-Roche L, Díaz-Batista A, Pérez-Davison G, Re L.
Eur J Pharmacol. 2012 Sep 15;691(1-3):156-62. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.07.010. Epub 2012 Jul 13.

6. **Long-term cerebrovascular reactivity mediated by ozone autohemotherapy: a NIRS study**
G. Lintas1, W. Liboni2, V. Simonetti3,4, M. Franzini4, L. Valdenassi4, F. Vaiano4, S. Pandolfi4 and F. Molinari1
1 Biolab, Dept. of Electronics and Telecommunications, Politecnico di Torino, Torino, Italy
2 “Un passo insieme” ONLUS Fundation, Torino, Italy
3 Kaos ONLUS Fundation, Torino, Italy
4 Società Italiana di Ossigeno e Ozono Terapia, Bergamo, Italy
GNB2012, June 26th-29th 2012, Rome, Italy

7. **Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot.**
Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS.

Center of Studies for Research and Biological Evaluation (CEIEB-IFAL), University of Havana, Havana 10400, Cuba.

Eur J Pharmacol. 2005 Oct 31;523(1-3):151-61. Epub 2005 Sep 29.

8. The effects of medical ozone therapy on renal ischemia/reperfusion injury.
Oztosun M, Akgul EO, Cakir E, Cayci T, Uysal B, Ogur R, Ozcan A, Ozgurtas T, Guven A, Korkmaz A.

Health Services Command, Turkish Armed Forces, Ankara, Turkey.

Ren Fail. 2012;34(7):921-5. doi: 10.3109/0886022X.2012.692752. Epub 2012 Jun 11.

9. Selective ozone concentrations may reduce the ischemic damage after a stroke.
Frosini M, Contartese A, Zanardi I, Travagli V, Bocci V.

Dipartimento di Neuroscienze, Sezione di Farmacologia, Universit à degli Studi di Siena, Italy.

Free Radic Res. 2012 May;46(5):612-8. doi: 10.3109/10715762.2012.659247. Epub 2012 Feb 14.

10. Brain ischemia and hypometabolism treated by ozone therapy.
Clavo B, Suarez G, Aguilar Y, Gutierrez D, Ponce P, Cubero A, Robaina F, Carreras JL.
Forsch Komplementmed. 2011;18(5):283-7. doi: 10.1159/000333795. Epub 2011 Oct 13.

11. Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy.
Foglieni C, Fulgenzi A, Belloni D, Sciorati C, Ferrero E, Ferrero ME.

Clinical Cardiovascular Biology Laboratory, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy.

BMC Nephrol. 2011 Nov 14;12:61. doi: 10.1186/1471-2369-12-61.

12. [The use of ozone and low-intensive laser irradiation in complex treatment of complicated duodenal ulcer].
[Article in Russian]
Mamedov RA, Agamirova AN, Dadashev AI, Gasymov ÉM, Kurbanov FS, Dobrovol'skiĭ SR.
Khirurgiia (Mosk). 2011;(7):53-5.

13. Ozone therapy prevents renal inflammation and fibrosis in a rat model of acute pyelonephritis.

Caliskan B, Guven A, Ozler M, Cayci T, Ozcan A, Bedir O, Surer I, Korkmaz A.

Scand J Clin Lab Invest. 2011 Oct;71(6):473-80. doi: 10.3109/00365513.2011.587022.

14. Inhibition of iNOS reduces the therapeutic effects of ozone in acute necrotizing pancreatitis: an in vivo animal study.
Oztas Y, Uysal B, Kaldirim U, Poyrazoglu Y, Yasar M, Cayci T, Cekli Y, Sadir S, Ozler M, Topal T, Oter S, Korkmaz A.

Department of Medical Biochemistry, Hacettepe University Faculty of Medicine, Sihhiye, Ankara, Turkey. yoztas@hacettepe.edu.tr

Scand J Clin Lab Invest. 2011 Sep;71(5):370-7. doi: 10.3109/00365513.2011.572183. Epub 2011 Apr 4.

15. Ozone: a new therapeutic agent in vascular diseases.
Bocci V, Zanardi I, Travagli V.

Department of Physiology, University of Siena, Siena, Italy. bocci@unisi.it

Am J Cardiovasc Drugs. 2011;11(2):73-82. doi: 10.2165/11539890-000000000-00000.

16. Preliminary results of ozone therapy as a possible treatment for patients with chronic hepatitis C.
Zaky S, Kamel SE, Hassan MS, Sallam NA, Shahata MA, Helal SR, Mahmoud H.

Department of Tropical Medicine and Gastroenterology, Assiut University, Assiut, Egypt.

J Altern Complement Med. 2011 Mar;17(3):259-63. doi: 10.1089/acm.2010.0016.

17. Effect of hyperbaric oxygen and ozone preconditioning on oxidative/nitrosative stress induced by tourniquet ischemia/reperfusion in rat skeletal muscle.
Koca K, Yurttaş Y, Yıldız C, Caycı T, Uysal B, Korkmaz A.

GATA, Department of Orthopedics, Ankara, Turkey. drkenankoca@yahoo.com

Acta Orthop Traumatol Turc. 2010;44(6):476-83. doi: 10.3944/AOTT.2010.2327.

18. Ossigeno-ozonoterapia: una terapia poco conosciuta, ma molto efficace.
V.Simonetti
Cardio Piemonte, 2010.

19. The effect of rectal ozone on the portal vein oxygenation and pharmacokinetics of propranolol in liver cirrhosis (a preliminary human study).
Zaky S, Fouad EA, Kotb HI.
Br J Clin Pharmacol. 2011 Mar;71(3):411-5. doi: 10.1111/j.1365-2125.2010.03851.x.

20. Comparison of hyperbaric oxygen and medical ozone therapies in a rat model of experimental distal colitis.
Altinel O, Demirbas S, Cakir E, Yaman H, Ozerhan IH, Duran E, Cayci T, Akgul EO, Ersoz N, Uysal B, Kurt B, Yasar M, Oter S, Peker Y.

Department of General Surgery, Gulhane Military Medical Academy, Ankara, Turkey. ozcanaltinel@gmail.com

Scand J Clin Lab Invest. 2011 May;71(3):185-92. doi: 10.3109/00365513.2010.548875. Epub 2011 Jan 4.

21. Diabetes and chronic oxidative stress. A perspective based on the possible usefulness of ozone therapy.
Bocci V, Zanardi I, Huijberts MS, Travagli V.
Department of Physiology, University of Siena, Via A. Moro 2, 53100 Siena, Italy. bocci@unisi.it
Diabetes Metab Syndr. 2011 Jan-Mar;5(1):45-9. doi: 10.1016/j.dsx.2010.05.014. Epub 2010 Jun 7.

22. Effect of medical ozone therapy on renal blood flow and renal function of patients with chronic severe hepatitis.
Gu XB, Yang XJ, Zhu HY, Xu YQ, Liu XY.
Chin Med J (Engl). 2010 Sep;123(18):2510-3.

23. The effects of colorectally insufflated oxygen-ozone on red blood cell rheology in rabbits.
Artis AS, Aydogan S, Sahin MG.
Clin Hemorheol Microcirc. 2010;45(2-4):329-36. doi: 10.3233/CH-2010-1316.

24. Treatment of refractory radiation-induced hemorrhagic proctitis with ozonetherapy.
Clavo B, Gutierrez D, Ceballos D, Rovira G, Suarez G, Lopez L, Pinar B, Cabezon A, Rabano AI, Oliva E, Fiuza MD:
Radiother Oncol 2010;96:379.

25. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy and medical ozone therapy in experimental acute necrotizing pancreatitis.
Uysal B, Yasar M, Ersoz N, Coskun O, Kilic A, Cayc T, Kurt B, Oter S, Korkmaz A, Guven A.
Pancreas. 2010 Jan;39(1):9-15. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181bb5ae3.

26. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and intestinal damage in an experimental model of necrotizing enterocolitis in neonatal rats.
Guven A, Gundogdu G, Vurucu S, Uysal B, Oztas E, Ozturk H, Korkmaz A.
J Pediatr Surg. 2009 Sep;44(9):1730-5. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2009.01.007.

27. Ozonized autohaemotransfusion could be a potential rapid-acting antidepressant medication in elderly patients.
Coppola L, Luongo C, Pastore A, Masciello C, Parascandola RR, Mastrolorenzo L, Grassia A, Coppola A, De Biase M, Lettieri B, Gombos G.
Int J Geriatr Psychiatry. 2010 Feb;25(2):208-13. doi: 10.1002/gps.2322.

28. May oxygen-ozone therapy improves cardiovascular disorders?
Bocci V, Travagli V, Zanardi I.
Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2009 Jun;9(2):78-85. Review.

29. Intramuscular Oxygen-Ozone Therapy in the Treatment of Acute Back Pain With Lumbar Disc Herniation
A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Clinical Trial of Active and Simulated Lumbar Paravertebral Injection
Marco Paoloni, MD,*† Luca Di Sante, MD,*† Angelo Cacchio, MD,† Dario Apuzzo, MD,†
Salvatore Marotta, MD,‡ Michele Razzano, MD,‡ Marianno Franzini, MD,§
and Valter Santilli, MD*†
SPINE Volume 34, Number 13, pp 1337–1344 ©2009, Lippincott Williams & Wilkins

30. [Application of ozone therapy in complex treatment of patients with acute necrotizing pancreatitis].
Kopchak VM, Khomiak IV, Duvalko AV, Stasenko AA, Dieiev VA.
Klin Khir. 2008 Oct;(10):28-31. Ukrainian.

31. [Use of ozonotherapy (OT) in combined treatment of patients with discirculatory encephalopathy (DEP)].
Struchkov PV, Selitskiĭ GV, Korobeĭnikova MV, Zubkova AV.
Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. 2008 Mar-Apr;(2):10-3. Russian.

32. Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide.
Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, Chen Z.
J Surg Res. 2008 Oct;149(2):287-95. doi: 10.1016/j.jss.2007.12.756. Epub 2008 Jan 17.

33. [Cardiohemodynamic effects of the ozone therapy in patients with essential hypertension].
Ruzov VI, Drapova DP, Gimaev RKh, Auadi Kh, Iudina EE.
Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult. 2007 Sep-Oct;(5):15-7. Russian.

34. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation.
Bocci V, Aldinucci C.
J Biochem Mol Toxicol. 2006;20:133-138.

35. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation (EBOO): a controlled trial in patients with peripheral artery disease.
Di Paolo N, Bocci V, Salvo DP, Palasciano G, Biagioli M, Meini S, Galli F, Ciari I, Maccari F, Cappelletti F, Di Paolo M, Gaggiotti E.
Int J Artif Organs. 2005 Oct;28(10):1039-50.

36. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. Int J Biol Macromol.
Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V.
2007;41:504-511.

37. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma.
Bocci V
Toxicol Appl Pharmacol. 2006;21:493-504.

38. Acute oxygen-ozone administration to RATS protects the heart from ischemia reperfusion infarct
C. Di Filippo1,*, R. Marfella2,*, P. Capodanno3, F. Ferraraccio4, L. Coppola2, M. Luongo3, L. Mascolo3, C. Luongo3, A. Capuano1, F. Rossi1, M. D'Amico1
1 Department of Experimental Medicine, Section of Pharmacology “L. Donatelli”, Second University of Naples, Via Costantinopoli 16,
80138 Naples, ITALY, e-mail: michele.damico@unina2.it
2 Department of Geriatrics and Metabolic Diseases Second University of Naples, Italy
3 Department of Anaestesiological, Surgical and Emergency Sciences, Second University of Naples, Italy
4 Department of Clinical, Public and Preventive Medicine Second University of Naples, Italy
Received 29 May 2007; returned for revision 29 October 2007; received from final revision 12 December 2007;

39. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot.
Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS.
Eur J Pharmacol. 2005 Oct 31;523(1-3):151-61. Epub 2005 Sep 29.

40. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozoneoxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion.
Ajamieh HH, Berlanga J, Merino N, Sanchez GM, Carmona AM, Cepero SM, Giuliani A, Re L, Leon OS:
Transpl Int 2005, **18**(5):604-612.

41. Ozone Therapy on Cerebral Blood Flow: A Preliminary Report.
Clavo B, Catalá L, Pérez JL, Rodríguez V, Robaina F.
Evid Based Complement Alternat Med. 2004 Dec;1(3):315-319. Epub 2004 Oct 6.

42. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion.
Ajamieh HH, Menendez S, Martinez-Sanchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, Fernandez OS: Liver Int 2004;24:55–62.

43. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: an oxygen-controlled study.
Biedunkiewicz B, Tylicki L, Nieweglowski T, Burakowski S, Rutkowski B.
Int J Artif Organs. 2004 Jan;27(1):29-34.

44. Necrotizing fasciitis successfully treated with extracorporeal blood oxygenation and ozonization (EBOO).
Di Paolo N, Bocci V, Cappelletti F, Petrini G, Gaggiotti E.
Int J Artif Organs. 2002 Dec;25(12):1194-8.

45. Ozonized autohaemotransfusion and fibrinolytic balance in peripheral arterial occlusive disease.
Coppola L, Lettieri B, Cozzolino D, Luongo C, Sammartino A, Guastafierro S, Coppola A, Mastrolorenzo L, Gombos G.
Blood Coagul Fibrinolysis. 2002 Dec;13(8):671-81.

46. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease.
Giunta R, Coppola A, Luongo C, Sammartino A, Guastafierro S, Grassia A, Giunta L, Mascolo L, Tirelli A, Coppola L.
Ann Hematol. 2001 Dec;80(12):745-8. Epub 2001 Oct 13.

47. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats.
Al-Dalain SM, Martínez G, Candelario-Jalil E, Menéndez S, Re L, Giuliani A, León OS.
Pharmacol Res. 2001 Nov;44(5):391-6.

48. [Ozone therapy of chronic mandibular osteomyelitis].
Agapov VS, Shulakov VV, Fomchenkov NA.
Stomatologiia (Mosk). 2001;80(5):14-7. Russian.

49. Beneficial clinical effects of ozonated autohemotherapy in chronically dialysed patients with atherosclerotic ischemia of the lower limbs--pilot study.
Tylicki L, Niew głowski T, Biedunkiewicz B, Burakowski S, Rutkowski B.
Int J Artif Organs. 2001 Feb;24(2):79-82.

50. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance.
Peralta C, León OS, Xaus C, Prats N, Jalil EC, Planell ES, Puig-Parellada P, Gelpí E, Roselló-Catafau J.
Free Radic Res 1999; 31:191–196.

51. Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion.
Peralta C, Xaus C, Bartrons R, Leon OS, Gelpi E, Rosello-Catafau J.
Free Radic Res 2000; 33:595–605.

52. Susceptibilities of plasma antioxidants and erythrocyte constituents to low levels of ozone.
Shinriki N, Suzuki T, Takama K, Fukunaga K, Ohgiya S, Kubota K, Miura T.

Sapporo Branch of Tsukuba Materials Information Laboratory, Sapporo, Japan.

Haematologia (Budap). 1998;29(3):229-39.

53. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals.
Leon OS, Menendez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Perez L, Cruz E, Bocci V.
Mediators Inflamm 1998; 7:289– 294.

54. Studies on the biological effects of ozone: Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone.
Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, et al.
J Biol Regul Homeost Agents. 1998;12:67-75.

55. The isoprostanes;unique bioactive products of of lipid peroxidation
Morrow J.D., Jackson Roberts
Prog. Lipid. Res. 36;1-21 1997

56. Ozonoterapia en la enfermedad cerebrovascular isquemica.
Rodriguez MM, Garcia JR, Menendez S, Devesa E, Valverde S:
Revista CENIC Ciencias Biologicas 1998;29:145–148.

57. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy.
Hernandez F, Menendez S, Wong R.
Free Radic Biol Med 1995; 19:115–119.

58. A new mechanism for the toxicity of ozone
Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M..
Toxicol Lett. 1995;82-83:287–93.

59. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products.
Pryor, W.A., Squadrito, G.L., Freidman, M
Free Rad. Biol.Med.>>, 19:935-941. 1995

60. Ozone therapy in the advanced stages of arteriosclerosis obliterans.
Romero Valdes A, Menendez Cepero S, Gomez Moraleda M, Ley Pozo J.
Angiologia 1993; 45:146–148.

61. Can ozone administration activate the tissue metabolism? A study on brain metabolism during hypoxic hypoxia.
Shiratori R, Kaneko Y, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Sano H, Ishizu Y, Yamamoto T:
Masui 1993;42:2–6.

62. Studies on the biological effects of ozone, 3: an attempt to define conditions for optimal induction of cytokines.
Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Paulesu L, Di Stefano A
Lymphokine Cytokine Res. 1993;12:121-126.

63. Chemical nature and immunotoxicological properties of arachidonic and degradation products formed by exposure to ozone
Madden M.C., Friedmen M.,Hanley N., Siegler E., Quay J.,Becker S.,Devlin R., Koren H.
Environ Health Perspect 101:154-164 (1993)

64. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events
Sheran C.N.
Biochim. Biofis. Acta 1212:1-25 1994

65. Study of biological effects of ozone :induction of tumor necrosis factor (TNF-ά)on human leucocytes
Paulesu L., Bocci V., Luzzi E.
Limphokine Citokine Res 1991 10:409-412

66. Activities of pentose shunt and glygolyticenzymes in lungs of ozone exposed rats
Chow C.K , Tappel A.L.
Arch. Environ Health 26:205-208 (1973)

67. Ozone and human blood
Buckley, R.D. , Hackney, J-D.,Clark K,,Posin C.
Arch. Environ Health 30:40-43 (1975)

68. Reaction of ozone whit human erythrocytes
Freeman B.A., Miller B.E.,Mudd J.B.,
In : Lee S.D., Mudd J.B., Assessing toxic effect of environmental pullutants
Ann Arbor Science Publisher, Ann Arbor Mich, 151-171 (1979)

69. "Progress of near-infrared spectroscopy and topography for brain and muse/e clinical applications",
WolfM., Ferrari M., Quaresima Q, Journal of Biomedicai Optics, Volume 12 (6) November/December 2007

70. "Functional cerebral activation detected by an integrated System combining CW-NIR spectroscopy and EEG",
Rovati L, Fonda S. Et al, SPIE Bios - Photonics West, January 2004

71. "Combining near-infrared spectroscopy and electroencephalography to monitor brain function",
Salvatori G., BulfL, Fonda S., Rovati L,
IMTC 2005, Instrumentation and Measurement Technology conference, Sorrento, Italy, April 2006

72. Caratterizzazione tempo-frequenza dell'autoregolazione cerebrale durante ozono auto-emoterapia: studio mediante spettroscopia nel vicino infrarosso
Arianna Ghezzi
Tesi di Laurea Politecnico di Torino - Dicembre 2012

73. "Near-Infrared Spectroscopy/Imaging for monitoring muscle oxygenation and oxidative metabolism in healthy and disease humans",
Takafumi, H, McCully K., Quaresima V., Katsuyuki Y., Chance B.,
Journal of Biomedical Optics, Volume 12 (6) November/December 2007

74. "Progress of near-infrared spectroscopy and topography for brain and muscle clinical applications",
Wolf M., Ferrari M., Quaresima Q,
Journal of Biomedical Optics, Volume 12 (6) November/December 2007

75. "Non invasive in-vivo analysis of rat brain activities",
F. Crespi, A.C. Croce, G. Bottiroli, A. Bandiera, M. Donini, L. Rovati, C. Heidbreder,
10th International Conference on In Vivo Methods,
Stockholm, Sweden, June 24-27 2003
Pag.7/8 Rev. A - maggio 2011

76. **Caratterizzazione tempo-frequenza dell'autoregolazione cerebrale in soggetti emicranici,**
S.Rosati
Tesi di laurea specialistica, Politecnico di Torino, 2010.

77. **Analisi funzionali e profiling vascolare di soggetti diabetici mediante spettroscopia nell'infrarosso vicino,**
S.Calò,
Tesi di laurea specialistica, Politecnico di Torino, 2011.

78. **Results of a non-specifi c immunomodulation therapy in chronic heart failure (ACCLAIM trial): a placebo-controlled randomised trial**
Guillermo Torre-Amione, Stefan D Anker, Robert C Bourge, Wilson S Colucci, Barry H Greenberg, Per Hildebrandt, Andre Keren, Michael Motro,
Lemuel A Moyé, Jan Erik Otterstad, Craig M Pratt, Piotr Ponikowski, Jean Lucien Rouleau, Francois Sestier, Bernhard R Winkelmann,
James B Young, for the Advanced Chronic Heart Failure CLinical Assessment of Immune Modulation Therapy Investigators
Lancet 2008; 371: 228–36

79. **4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophisiological implication**
Parola M.,Bellomo G.,Robino G.,Barrera G.,Dianzani M.U.
Antiox Redox Signal 1:255-284 1999

80. **Caratterizzazione tempo-frequenzadell'autoregolazione cerebrale durante ozono auto-emoterapia: studio mediante spettroscopia nel vicino infrarosso**
Relatore: Ing. Filippo Molinari Candidato:Arianna Ghezzi Dicembre 2012

81. **Vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Subarachnoid hemorrhage: patophysiology and management.**
Zabramski JM,Bederson JB,
Park Ridge, IL 1997, 127-156.

82. **Vasospasm after subarachnoid hemorrhage, in Bederson JB (ed): Subarachnoid hemorrhage: patophysiology and management.** .
Zabramski JM
Park Ridge, IL: The American Association of Neurological Surgeons, 1997: 127-156.

83. **Autoregulatory vasodilatation of parenchimal vessels is impaired durino cerebral vasospasm. J Cereb Blood Flow**.
Yundt K, Grubb R et Al:
Metab 18: 419-424, 1988

84. Persistent autoregolatory disturbance after angioplasty for cerebral vasospasm. A case report.
Song DK, Harrigan MR et Al:
Interventional Neuroradiology 8: 409-415, 2002.

85. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning.
Fisher CM, Kistler JP et Al:
Neurosurgery 6: 1-9, 1980.

86. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. Dumont AS, Dumont RJ et Al:
Neurosurgery 53: 123, 2003.

87. Cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage.
Stura G, Ferrio MF et Al: Rivista di Neuroradiologia 15: 611-614, 2002.

88. Il risultato del trattamento chirurgico o endovascolare degli aneurismi endocranici rotti e non rotti. Valutazione clinica e neuropsicologica. Risultati preliminari di uno studio multicentrico. (SiNch 2011 Firenze).
A. De Santis *, M. Cenzato **, R. Delfini*** , S.M. Gaini****, R. Galzio *****, A.Santoro***
Neurochirurgia Univ. I.O. Galeazzi IRCCS MIlano*; Neurochirurgia Univ. Brescia**;
Neurochirurgia Umberto I° La Sapienza Roma ***; Neurochirurgia Univ. Policlinico
MIlano****; Neurochirurgia Univ. L'Aquila *****

89. Vasospasmo e deficit ischemico nell'emorragia subaracnoidea: clipping vs. coiling (SiNch 2011 Firenze).
A. Conti, C. Alafaci, F.F. Angileri, S. Priola, F. Tomasello (Messina)

90. Kassell NF, Helm G et Al: The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery.
J Neurosurg 73: 18-36, 1990.

91. Initial and recurrent bleeding are the majot causes of death following subarachnod hemorrage.
Broderick JP, Brott TG et Al:
Stroke 25: 1342-1347, 1994.

92. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat.
Bederson JB, Germano IM et Al
Stroke 26: 1086-1091, 1995.

93. Hemodynamics of subarchnoid hemorrhage arrest.
McCormick PW, McCormick J et Al:
J Neurosurg 80: 710-715, 1994.

94. A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional bllod flow, autoregulation carbon dioxide reactivity and central conduction time.
Jakubowski J, Bell BA et Al:
Stroke 13: 601-611, 1982.

95. Effect of intracarotid nitric oxide on primate cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage.
Afshar JKB, Pluta RM et Al:
J Neurosurg 83: 118-122, 1995.

96. A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional bllod flow, autoregulation carbon dioxide reactivity and central conduction time.
Jakubowski J, Bell BA et Al:
Stroke 13: 601-611, 1982.

97. Significance of ultra-early rebleeding in SAH.
5. Hillman J, von Essen C et Al:
J Neurosurg 68: 901, 1988.

98. Aneurysmal rebleeding: a preliminary report from the cooperative aneurysm study.
Kassel NF, Torner JC:
Neurosurgery 13:479, 1983.

99. Incidence and significance of early aneurysmal rebleeding before neurosurgical or neurological management.
Tsurutani H, Suzuki S:
Stroke 32: 1176, 2001.

100. The risk of rebleeding from ruptured intracranial aneurysms.
Rosenorn J, Eskesen V et Al:
J Neurosurg 67: 329, 1987.

101. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm.
MacDonald RL,Weir BK:
Stroke 22: 971-982, 1991.

102. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm.
MacDonald RL,Weir BK:
Stroke 22: 971-982, 1991.

103. Biological defence mechanism in the pathogenesis of prolonged cerebral vasospasm in the patients with ruptured intracranial anuerysms.
Sasaki S, Kuwabara H et Al
Stroke 17, 1986.