



LAUVNO

NLM -- W1 RI555D (GENCOLL)

VA MEDICAL CENTER  
 CLINICAL INFORMATION MANAGEMENT-LIBRARY  
 Attn: Mary Hess  
 BATON ROUGE, LA 70806

ATTN:	SUBMITTED:	2006-02-16 09:52:29
PHONE: 225-761-6850	PRINTED:	2006-02-16 11:53:26
FAX: 225-761-6805	REQUEST NO.:	REG-13715866
E-MAIL: mary.hess@med.va.gov	SENT VIA:	DOCLINE
	DOCLINE NO:	19260883

REG	Copy	Journal
-----	------	---------

TITLE:	RIVISTA DI NEURORADIOLOGIA
PUBLISHER/PLACE:	Edizioni del Centauro [Udine :
VOLUME/ISSUE/PAGES:	2001;14(suppl 1):17-22 17-22
DATE:	2001
AUTHOR OF ARTICLE:	Richelmi P
TITLE OF ARTICLE:	Basi farmacologiche dell'azione del'ossigenozono
ISSN:	1120-9976
OTHER NUMBERS/LETTERS:	
	NLM Unique ID: 8906248
SOURCE:	Unique Key
MAX COST:	\$0.00
COPYRIGHT COMP.:	Guidelines
CALL NUMBER:	W1 RI555D (GENCOLL)
REQUESTER INFO:	Dr. Dumitrescu (mihnea@mac.com
DELIVERY:	E-mail: mary.hess@med.va.gov
REPLY:	Mail:

KEEP THIS RECEIPT TO RECONCILE WITH BILLING STATEMENT

For problems or questions, contact NLM at [http://wwwcf.nlm.nih.gov/ill/ill\\_web\\_form.cfm](http://wwwcf.nlm.nih.gov/ill/ill_web_form.cfm) or phone 301-496-5511.

Include LIBID and request number.

NOTE: THIS MATERIAL MAY BE PROTECTED BY COPYRIGHT LAW (TITLE 17, U.S. CODE)

# Basi farmacologiche dell'azione dell'ossigeno-ozono terapia

P. RICHELMI, L. VALDENASSI, F. BERTÈ

*Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Facoltà di Medicina e Chirurgia; Università degli Studi di Pavia*

**RIASSUNTO** – Le tappe fondamentali dell'O<sub>3</sub> nell'organismo sono, a quanto oggi noto, le seguenti:

Il trattamento di 300 g di sangue con ozono 80 µg/cc induce dopo 5 minuti il massimo valore della pO<sub>2</sub> mentre i valori del pH e della pCO<sub>2</sub> rimangono invariati.

L'O<sub>3</sub> ha una emivita brevissima (circa un secondo) e si decompone in modo rapidissimo nel plasma generando una cascata di prodotti ossidanti tra i quali fondamentali sono i lipoperossidi e gli ozonidi. Questi ultimi composti, pure con emivita relativamente breve, sono necessari per l'attivazione cellulare.

La presenza dei composti ossidanti generati dall'O<sub>3</sub> non comporta effetti tossici per le cellule perché sia il plasma che l'ambiente intracellulare contengono una varietà di sostanze e sistemi enzimatici antiossidanti, capaci di bloccare l'eventuale eccesso di sostanze ossidanti.

All'interno della sacca non vi è formazione di metemoglobina e l'emolisi massima non supera 2,4 ± 0,5%, questo valore è circa 25 volte inferiore a quello che potrebbe causare emoglobinuria da overflow.

L'aumento massimo del glutatione ossidato intraeritrocitario non supera il 10% ed è totalmente reversibile in circa 30 minuti, mentre i lipoperossidi plasmatici aumentano di 2-3 volte subito dopo l'ozonizzazione e ritornano a valori normali in circa 9 ore.

Non si osservano danni morfologici cellulari rilevabili con microscopia elettronica, né modificazioni della vitalità cellulare.

In vivo durante autoemoterapia è stato notato aumento del 2,3 difosfoglicerato (2,3 DPG) negli eritrociti che, provocando uno spostamento a destra della curva di dissociazione della emoglobina, favorisce la cessione di O<sub>2</sub> ai tessuti.

È interessante e significativo osservare una induzione della produzione di citochine quali interferone (IFN) α, β e γ, fattore della necrosi tumorale (TNF α), interleuchine (IL) 1, 2, 4, 6, 8 e 10, granulopoietine (GM-CSF), e transforming growth factor β (TGF β).

## Pharmacological Principles Underlying Oxygen-Ozone Therapy

**Key words:** oxygen-ozone therapy, free radicals

**SUMMARY** – The oxygen/ozone mixture (also called medicinal ozone) used in medicine is 1-40 µg/ml of oxygen, i.e. ozone concentrations are about thirty times lower than those applied in industry. Ozone affects the metabolism of oxygen enhancing the flexibility of erythrocyte membranes with a consequent improvement in blood circulation.

Oxidation reactions preferably occur with molecules for which ozone has an affinity. This preferential mechanism is important because it is the basis of the body's ability to protect itself from possible negative effects of ozone such as the inactivation and destruction of aminoacids and the peroxidation of molecular complexes like lipids and/or nucleic acids. The result of ozone's action on coenzymes and directly on organic substances is its effect on three key metabolic lines. In glucidic metabolism, ozone accelerates glycolysis. Ozone mainly intervenes in protein metabolism due to its marked affinity for sulphhydryl groups (e.g.

glutathione). However, aminoacids and hence protein molecules in the body are protected from inactivation by ozone by two reactions which prevent their degradation: the oxidation of glutathione followed by the oxidation of the coenzymes NADH and NADPH. In lipid metabolism, ozone reacts directly with the unsaturated fatty acids. In an environment rich in water, this reaction leads to the formation of peroxidases with subsequent hydrolytic fission of the lipid chains.

These effects on metabolism explain the action of ozone which includes: positive changes in the rheology of the microcirculation and reduction mechanism of haemoglobin resulting in greater oxygen uptake by tissues; bactericidal, fungicidal and virus-inactivating effect; anti-inflammatory and analgesic effects; effect on the immune system.

Ozone is only toxic when inhaled as it leads to congestion and inflammation of the airways with possible irreversible structural changes to the ciliated cells. Oxygen-ozone mixture administered by injection has no significantly toxic effects, as shown by a large clinical series.

## Introduzione

L'ozono, componente naturale dell'atmosfera, è una forma allotropica dell'ossigeno, con simbolo  $O_3$  e peso molecolare 48; si trova nell'aria alla quantità media di 0,02 mg per  $m^3$ .

La sua solubilità in acqua è maggiore di quella dell'ossigeno, reagisce con i composti organici contenenti doppi o tripli legami addizionando i tre atomi di ossigeno al legame non saturo con formazione di ozonidi. I gruppi  $-SH$ ,  $=S$ ,  $-NH_2$ ,  $=NH$ ,  $-OH$  e  $-CHO$  dei composti organici sono facilmente ossidati dall' $O_3$ , mentre non vengono quasi affatto attaccati gli idrocarburi saturi<sup>1</sup>.

La reazione dell'ozono con sostanze organiche insature che contengono un doppio legame è una caratteristica molto importante, l'ozono, infatti, reagisce a livello di questo doppio legame provocandone la scissione; questa reazione viene definita "ozonolisi"<sup>15</sup>.

La reazione avviene in due fasi: nella prima si ha l'addizione di ozono al legame non saturo con formazione dell'ozonide corrispondente, nella seconda questo si decompone. Nello studio della struttura dei composti organici, l' $O_3$  permette di individuare la posizione nella molecola dei legami non saturi e si utilizza anche per preparare aldeidi e acidi.

In un mezzo acquoso come il sangue gli ozonidi si trasformano immediatamente in idroperossidi stabili. I perossidi hanno la capacità di cedere ossigeno quando aumenta il pH, per esempio negli ambienti protonici, caratteristica fisico-chimica ti-

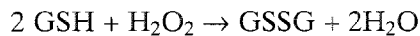
pica dei processi degenerativi e/o ischemici. I lipo-perossidi che derivano dalla rottura di una catena degli ozonidi perdono la idrofobicità caratteristica dei lipidi e diventano solubili in acqua poiché sono composti lipidici a catena breve<sup>4</sup>.

Occorre sottolineare che in campo medico si utilizza abitualmente una miscela di  $O_2O_3$  detta anche ozono medicale in cui l' $O_3$  è presente in concentrazioni 30 volte inferiori rispetto all'uso industriale: da 1 a 40  $\mu g/ml$  di ossigeno<sup>19</sup>.

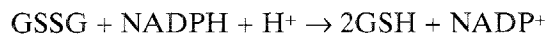
## Caratteristiche biochimiche dell'ossigeno-ozono terapia

Gli effetti e le indicazioni dell'ossigeno-ozono terapia, si basano essenzialmente sulle sue proprietà biochimiche. La più importante di queste è rapportabile alla capacità dell'ossigeno di legare elettroni (essendone l'ozono una forma allotropica). Ne risulta che la massima energia libera si ottiene dalla riduzione tetraelettronica ad acqua, che pertanto rappresenta il prodotto di massima riduzione dell'ossigeno. Anche la riduzione dell' $H_2O_2$  e dell' $OH^-$  è estremamente favorevole ma in questo caso il potenziale di ossido-riduzione è così alto da rendere queste reazioni indiscriminate nel loro attacco alle molecole circostanti. Quest'ultimo potrebbe essere l'aspetto negativo della riduzione biologica dell'ossigeno<sup>2,12</sup>; in quanto si può indurre un'accelerata degradazione delle membrane biologiche, anticipando l'invecchiamento delle cellule e conseguentemente degli organismi.

In realtà la cellula possiede dei sistemi che si oppongono all'accumulo di tali prodotti e li trasformano prima che essi possano risultare dannosi per la cellula stessa<sup>4</sup>. Così ad esempio, l'ozono dimostra una notevole affinità per il glutatione (GSH) che viene trasformato nella sua forma disolfidica dall'enzima GSH-perossidasi:



Il glutatione così ossidato, tramite l'enzima GSH-reduttasi viene nuovamente reso disponibile nella sua forma ridotta dalla seguente reazione:



Questo meccanismo svolge un ruolo di protezione dei lipidi di membrana dalla eventuale perossidazione, oltre a garantire la difesa degli acidi nucleici e delle proteine a livello endocellulare<sup>15</sup>.

Risulta chiaro come, in presenza di diversi substrati ossidabili, le reazioni di ossidazione avvengano preferibilmente con quelli verso cui l'ozono ha maggiore affinità. Solo dopo l'esaurimento del primo substrato si avrà la reazione con un'altra sostanza e così di seguito. Questo meccanismo di "priorità" è molto importante perché su di esso si basano le capacità dell'organismo di proteggersi da eventuali effetti negativi dell'ozono. Fondamentale, per la comprensione degli effetti dell'ozono è illustrarne la sua azione sui coenzimi. Come è noto i coenzimi hanno una notevole importanza nel metabolismo perché si inseriscono tra gli enzimi formando intermedi attraverso cui diventa possibile lo scambio di "sostanze"<sup>11</sup>.

Conseguenza dell'azione dell'ozono sui coenzimi e direttamente sulle sostanze organiche è il suo intervento sulle tre linee fondamentali del metabolismo:

**Metabolismo glucidico** – Uno degli effetti principali è l'accelerazione della glicolisi; com'è noto, infatti, condizione fondamentale per garantire la continuità del processo è la costante riossidazione del NADH (o nella catena respiratoria in presenza di ossigeno, o nei muscoli con la glicolisi anaerobia a spese dell'acido piruvico).

**Metabolismo protidico** – Nel metabolismo protidico, l'ozono interviene principalmente grazie alla sua notevole affinità verso i gruppi sulfidrilici. Un esempio tipico già riportato è la reazione con il peptide glutatione<sup>11</sup>.

L'ozono potrebbe reagire, con lo stesso meccanismo, con aminoacidi essenziali quali la metionina (contenente gruppi SH) ed il triptofano (quest'ultimo pur non contenendo gruppi sulfidrilici reagisce bene con l'ozono) nonché con altri ami-

noacidi contenenti zolfo (cisteina). Anche in questo caso gli aminoacidi risultano protetti dalla inattivazione da ozono da due reazioni che preven- gono la loro degradazione: anzitutto l'ossidazione del glutatione ed in seguito l'ossidazione dei coenzimi NADH e NADPH, reazioni chiave nel meccanismo biochimico dell'ozono<sup>15</sup>.

**Metabolismo lipidico** – L'ozono reagisce direttamente con gli acidi grassi insaturi, che presentano un doppio legame carbonio e sono quindi disponibili per una reazione ossidativa. La reazione porterebbe, in un ambiente particolarmente ricco di acqua, alla formazione di perossidi con seguente scissione idrolitica delle catene lipidiche. Le catene lipidiche vengono così frammentate con perdita del loro carattere idrofobo e si trasformano in componenti idrofili.

### Fisiopatologia dell'Ozono

Le premesse biochimiche portano ad alcune considerazioni inerenti le caratteristiche dell'O<sub>3</sub>, rendendo ragione dell'ampio spettro di azione dell'O<sub>3</sub> sull'organismo e dell'ampia gamma di indicazioni al suo utilizzo.

#### Effetti sul metabolismo

A) **Aumento della glicolisi** – L'elevata quantità di energia che si libera dalla demolizione aerobica del glucosio viene utilizzata per la sintesi di ATP, ma è evidente che l'efficienza del processo dipende dal continuo apporto di ossigeno<sup>16</sup>.

Vi sono circostanze nelle quali la richiesta di ATP da parte di diversi organi aumenta notevolmente (patologie degenerative, necrotiche o infiammatorie o nel muscolo scheletrico e cardiaco sottoposti ed un esercizio fisico violento). In questi casi l'improvviso aumento della richiesta di ATP può essere solo in parte soddisfatta da un aumento della velocità dei processi ossidativi mitocondriali e l'apporto di ossigeno rimane comunque insufficiente rispetto al fabbisogno. In queste condizioni è la glicolisi che riesce a sopperire la necessità di richiesta di ATP per assicurare il fabbisogno di energia necessaria al mantenimento dell'omeostasi cellulare nonché delle prestazioni richieste. Ciò rende evidente come l'accelerazione della glicolisi provocata dall'O<sub>3</sub>, in seguito alla sua azione sui coenzimi, conduce ad una aumentata formazione di ATP.

B) **Attivazione del metabolismo dei lipidi** – Questo effetto è ascrivibile all'ozono sia attraverso un intervento sul catabolismo dei grassi sia per un effetto lipolitico diretto. Tutto ciò ha come conseguenza una maggiore produzione di energia che

risulta utile in tutte quelle condizioni, soprattutto fisiologiche, in cui è richiesto un aumento del lavoro.

#### *Effetti sui globuli rossi e sul microcircolo*

La membrana eritrocitaria è composta strutturalmente da proteine, idrati di carbonio e fosfolipidi. La prima fase della reazione è rappresentata dalla reazione dell'ozono con i doppi legami degli acidi grassi insaturi della membrana degli eritrociti (addizione elettrofila), per cui perossidi a catena breve penetrano negli eritrociti stessi, influenzandone il metabolismo<sup>5</sup>. Ciò comporta un aumento della demolizione dello zucchero ed il prodotto più importante di questa concatenazione di reazioni è il 2-3 difosfoglicerato che, in quanto sostanza de-ossigenante, rappresenta l'elemento chiave dell'effetto terapeutico dell'ozono grazie allo spostamento a destra della curva di dissociazione dell'emoglobina<sup>10</sup>.

D'altro canto la formazione dei perossidi porterebbe ad un aumento degli ioni idrogeno all'interno dei globuli rossi, poiché l'emoglobina ossigenata si comporta come un acido più forte rispetto alla emoglobina deossigenata, tale modificazione del pH variando l'affinità dell'Hb per l'ossigeno porterebbe ad una maggiore cessione dello stesso (effetto Bohr).

#### *Azione sulla reologia*

La somministrazione di ozono induce, a basse concentrazioni, una riduzione della viscosità ematica globale e dell'aggregabilità piastrinica<sup>17</sup>.

Tali modificazioni eritrocitarie sono testimoniate da un aumento della filtrabilità eritrocitaria nei capillari più piccoli, dove le emazie invece di muoversi disordinatamente si allineano e procedono lungo l'asse del vaso disponendosi a pila (effetto Fahraeus-Lindquist), aumentano la deformabilità facilitando così gli scambi metabolici.

#### *Azione battericida, fungicida e virustatica*

L'azione battericida e fungicida discende dal contatto diretto tra l'ozono ed i microrganismi ed è dovuta alla distruzione della capsula sottoposta al processo ossidativo determinato dal gas e/o dai perossidi.

L'azione virustatica dell'ozono e quella dei suoi perossidi si esplica a carico dei recettori cellulari presenti sulla superficie virale in modo tale da impedire il contatto tra virus e cellula bersaglio; ne consegue che tutto il ciclo replicativo viene arrestato. Infatti la penetrazione del virus nella cellula

è possibile in quanto gli accettori del virus sono costituiti da N-acetilglucosamina mentre i recettori cellulari sono costituiti da N-acetilneuraminico<sup>16</sup>.

La coppia di elettroni libera appartenente all'azoto dell'N-acetilglucosamina rappresenta il punto di attacco da parte della molecola elettrofila dell'ozono e dei suoi perossidi. Il virus sottoposto al processo di ossidazione ed alla mutazione della configurazione elettronica del sito non potrebbe più formare legami con la cellula e pertanto verrebbe bloccato nella sua reazione di adesione e reso inattivo.

#### *Azione immunomodulante*

È stato osservato che agenti ossidanti come il perossido di idrogeno possano stimolare l'attivazione dei linfociti o dei monociti causando il rilascio di citochine tra cui: interferoni, fattore di necrosi tumorale ed interleuchine<sup>5</sup>.

Gli effetti dell'ozono in tal senso sono stati valutati in patologie autoimmunitarie, sia somministrandolo da solo sia in associazione a terapia immunosoppressiva. Si è giunti alla conclusione che tale gas riesce sia *in vitro* che *in vivo*, a determinare un effetto immunomodulante verificabile a livello ematico con la graduale riduzione delle immunoglobuline sieriche e la rapida caduta della clearance degli immunocomplessi circolanti. Dati di laboratorio consentono di evidenziare un ruolo induttivo da parte dell'O<sub>3</sub>, sulla produzione di diverse citochine, quali: (IFN) $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ ), interleuchina (IL) 1, 2, 4, 6, 8 e 10, granulopoietine (GM-CSF) e transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) (Paulesu et al., 1971). Tutto ciò apre un ampio campo di ricerca sugli eventuali sviluppi terapeutici dell'O<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nel trattamento di diverse patologie di origine immunitaria<sup>20</sup>.

#### *Azione analgesica ed antinfiammatoria*

La terapia con ozono induce una rapida scomparsa del dolore articolare e dell'edema e una normalizzazione della temperatura locale, con aumento della mobilità e funzionalità articolare<sup>18</sup>.

Tali effetti sono da ascrivere, con ogni probabilità, alla inibizione della sintesi delle prostaglandine proinfiammatorie o della liberazione di bradichinina o di composti alogogeni; alla neutralizzazione delle specie reattive dell'ossigeno stimolando la produzione locale di enzimi antiossidanti; all'inibizione del rilascio di proteinasi dai macrofagi e dai polimorfonucleati neutrofili; ad una modulazione della produzione di citochine proinfiammatorie<sup>6</sup>.

L'effetto dell'ozono sulle componenti del disco intravertebrale è complessa e molto discussa. Si ritiene comunque che l'ozono abbia effetti positivi sia sulla componente proteica che su quella glicidica e sull'acqua contenuta nel nucleo polposo<sup>7</sup>. In particolare si potrebbe realizzare un'attivazione del metabolismo locale per aumento dell'ossigenazione locale ed un effetto diretto sui componenti alterati del disco intervertebrale erniato<sup>18</sup>.

Ciò spiegherebbe il motivo dei positivi risultati riscontrati dopo ozono terapia nel trattamento di situazioni croniche molto diverse tra loro per costituzione patologica e per localizzazione<sup>8</sup>. Inoltre diverse affezioni attinenti l'apparato muscolo-scheletrico possono trarre vantaggio sia quando si tratti di eventi flogistici sia degenerativi. Questo in relazione ad una serie di effetti concatenati che, partendo da un miglioramento della microvascolarizzazione locale potrebbero causare allontanamento di sostanze algogene con relativa disinflammazione tessutale, riduzione di contrattura ed edemi, recupero di mobilità del rachide e quindi arresto dei meccanismi fisiopatologici della degenerazione.

### Tossicità dell'Ozono

Il maggiore preconcetto contro l'impiego in medicina dell'ozono è costituito dalla sua presunta tossicità. Condizione fondamentale per l'impiego dell'ozono nell'uomo è la dose somministrata, che non deve eccedere la capacità che gli enzimi antiossidanti (superossido dismutasi e catalasi) ed il glutatione hanno di impedire l'accumulo di anione superossido ( $O_2^-$ ) e del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). È stato peraltro dimostrato che la formazione di radicali liberi da parte dell'ozono si verifica soltanto in un mezzo a pH superiore a 8<sup>15</sup>.

A  $pH \leq 7,5$  predomina il meccanismo di reazione ionica sotto forma della classica ozonolisi, che determina principalmente la produzione di perossidi piuttosto che di radicali.

Si può quindi affermare che a dosi adeguate l'ozono non induce effetti indesiderati; vi è comunque la possibilità che alte concentrazioni possano originare molecole reattive quali i radicali liberi<sup>3,13</sup>. In condizioni fisiologiche esistono meccanismi di protezione anti-ossidativa che controllano la formazione degli stessi soltanto se questi aumentano

in modo incontrollato e/o vengono meno i sistemi di protezione, può verificarsi una "cascata" di fenomeni lesivi capaci di compromettere la struttura e la funzione delle cellule<sup>9</sup>.

#### a) Tossicità sull'animale

Ben diversa è la situazione quando l'ozono viene utilizzato come miscela  $O_2/O_3$  e quando vengono impiegate altre vie di somministrazione. Studi sperimentali sono stati condotti su conigli in cui il sangue prelevato e miscelato con  $O_2/O_3$  è stato reintrodotta, tramite la vena dell'orecchio, nell'animale. I rapporti emodinamici rilevati indicano un'assenza di tossicità, inoltre l'esame istopatologico ha confermato l'assenza di danni ascrivibili al trattamento.

#### b) Tossicità nell'uomo

Numerose esperienze cliniche indicano come gli effetti collaterali, da trattamento con miscele ossigeno/ozono, siano rari ed il più delle volte legati ad errori della tecnica di somministrazione. Uno studio effettuato in Germania su una casistica di 400.000 pazienti ha sottolineato la presenza di effetti indesiderati solo in 7 casi su 1.000.000 di applicazioni, tale incidenza corrisponde alla percentuale di solo lo 0,0007%.

### Conclusioni

Sulla base delle implicazioni farmacologiche e delle evidenze cliniche si può concludere che l'impiego dell'ozono medicale può essere vantaggioso nel trattamento di diverse patologie. Il fatto che tali affezioni possano avere connotazioni lontane tra loro, rende ragione dell'attività versatile che caratterizza questa metodica con la quale si possono affrontare problemi di natura vascolare periferica, di tipo infettivo o di cui il dolore costituisce la manifestazione più eclatante.

È fondamentale che nelle applicazioni terapeutiche vengano osservate precise linee guida e che le concentrazioni alle quali questa miscela è impiegata lo siano altrettanto. A questo scopo è bene approfondire la ricerca scientifica nell'ottica di una valida conferma e di una spiegazione più esauriente dei meccanismi d'azione che costituiscono la base di questa metodica.

**Bibliografia**

- 1 Aubourg P: L'Ozone medical: production, posologie, models d'applications cliniques. *Bull med Paris* 52: 745-749, 1938.
- 2 Bellomo G, Mirabelli F et Al: Glutathione-mediated mechanisms of defence against oxygen free radical-induced hepatotoxicity. *Human Toxicol* 8: 152, 1989.
- 3 Bellomo G, Mirabelli F et Al: Oxidative stress-induced plasma membrane blebbing and cytoskeletal alterations in normal and cancer cells. *Ann NY Acad Sci* 551: 128-130, 1989.
- 4 Bertè F, Vairetti M, Richelmi P: Ozono: problemi tossicologici con particolare riguardo alla formazione di radicali liberi. *Cong Naz Soc Ossigeno-Ozono Terapia, Punta Ala (Gr)* 1990: 1-6.
- 5 Bocci V. Autohemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. *J Int Med Res* 22: 131-144, 1994.
- 6 Bocci V, Luzzi E et Al: Studies on the biological effects of ozone: 3. An attempt to define conditions for optimal induction of cytokines. *Lymphokine Cytokine Res* 12: 121-126, 1993.
- 7 Bonetti M, Gualandi G: L'ossigeno-ozonoterapia nel conflitto disco-articolare. *Attualità e prospettive in terapia antalgica*. Ed. ESM 1995: 216-229.
- 8 Bonetti M, Valdenassi L et Al: Analisi dei risultati dopo trattamento con O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> nelle ernie intra ed extra foraminali lombari. *World Congress on Oxygen Ozone Therapy*, 1999.
- 9 Buckley RD, Hackney JD et Al: Ozone and human blood. *Arch Envir Health* 30: 40, 1975.
- 10 Coppola L, Verrazzo G et Al: Oxygen-ozone therapy and haemorrhological parameters in peripheral chronic arterial occlusive disease. *Trombosi e Aterosclerosi*. Vol 3 n. 2, marzo-aprile 1992.
- 11 Luongo C, Sammartino A et Al: "Fisica-chimica e biochimica dell'ozono". *Scienze algologiche* 172 Anno III Gennaio/Aprile 1990.
- 12 Mirabelli F, Salis A et Al: Surface blebbing and cytoskeletal abnormalities caused by sulphhydryl reagents in isolated hepatocytes. II. Oxidizing reagents. *Med Biol Environ* 16: 201-211, 1988.
- 13 Mirabelli F, Salis A et Al: Surface blebbing and cytoskeletal abnormalities caused by sulphhydryl reagents in isolated hepatocytes. I. Alkylating reagents. *Med Biol Environ* 16: 187-197, 1988.
- 14 Paulesu L, Luzzi E, Bocci V: Studies on the biological effects of ozone: 2. Induction of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) on human leucocytes. *Lymphokine and Cytokine Research* 19: 409-412, 1991.
- 15 Richelmi P, Valdenassi L: Aspetti biochimici ed implicazioni tossicologiche in ossigeno-ozono terapia. *Attualità e prospettive in terapia antalgica*. Ed. ESM 1995: 185-204.
- 16 Rilling S, Viebahn R: *The Use of Ozone in Medicine*. Haug KF (eds). II Edition. Heidelberg 1987: 7-187.
- 17 Rokitansky O, Rokitansky A et Al: *Die Ozontherapie bei peripheren, arteriellen Durchblutungsstörungen: Klinik, biochemische und blutgasanalytische Untersuchungen*. In: *Wasser. Ozon-Weltkongress, Berlin 1981*: 53-75.
- 18 Valdenassi L, Richelmi P et Al: *L'ossigeno-ozono nella medicina fisica e riabilitativa*. Medicina fisica e riabilitazione. G.N. Valobra Ed. Utet, 2000.
- 19 Viebahn R: *The use of ozone in medicine*. Karl F. Haug Publishers, Heidelberg 1994: 1-178.
- 20 Wenzel DG, Morgan DL: Interactions of ozone and anti-neoplastic drugs on rat lung fibroblasts and Walker rat carcinoma cells. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 40(2): 279-287, 1983.

Prof. Plinio Richelmi  
Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica  
Università di Pavia  
Piazza Botta, 10  
I-27100 Pavia  
e-mail: plinio@botta.unipv.it  
www.labtime.unipv.it