

# Aspetti salienti sui meccanismi di azione dell'ozono nella terapia medica contro la COVID-19

Salvatore Chirumbolo<sup>1\*</sup>, Luigi Valdenassi<sup>2</sup>, Vincenzo Simonetti<sup>2</sup>, Dario Bertossi<sup>3</sup>, Giovanni Ricevuti<sup>4</sup>, Marianno Franzini<sup>2</sup> and Sergio Pandolfi<sup>2,5</sup>

1 Department of Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, University of Verona, Verona Italy

2 SIOOT, High School in Oxygen Ozone Therapy, University of Pavia, Italy; SIOOT INTERNATIONAL, Communian Clinic, Gorle Bergamo, Italy

3 Department of Surgery, Dentistry, Paediatrics and Gynaecology Unit of Maxillo-Facial Surgery University of Verona, Verona, Italy

4 Department of Drug Science, University of Pavia, Italy

5 Villa Mafalda Clinics via Monte delle Gioie, Rome, Italy

Corrispondenza a:

Prof Salvatore Chirumbolo, PhD. Department of Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, University of Verona, Strada Le Grazie 9 37134, Verona, Italy

Tel +390458027645

e-mail [salvatore.chirumbolo@univr.it](mailto:salvatore.chirumbolo@univr.it)

Gli autori dichiarano di non avere conflitti d'interesse

## Riassunto

Un numero crescente di pubblicazioni in letteratura mostra che l'ozono medicale (O<sub>3</sub>) viene utilizzato, con risultati incoraggianti, nel trattamento dei pazienti COVID-19, ottimizzando il sollievo dal dolore e dai sintomi, i parametri respiratori, i marker infiammatori e della coagulazione e lo stato di salute generale, quindi riducendo significativamente il tempo di ricovero e in terapia intensiva dei pazienti. Ad oggi, a parte i meccanismi che tengono conto della capacità dell'O<sub>3</sub> di attivare una rapida risposta allo stress ossidativo, aumentando la regolazione degli enzimi antiossidanti e di scavenging, nessuna ipotesi valida è stata indirizzata per tentare una sinossi di come l'O<sub>3</sub> dovrebbe agire sulla COVID-19. La conoscenza di come l'O<sub>3</sub> agisce sui meccanismi di infiammazione e di trombosi è della massima importanza per rendere i medici dotati di nuove armi contro la pandemia di SARS-CoV2. Questa rassegna cerca di affrontare questo problema, in modo da espandere il dibattito nella comunità scientifica.

## **Tabella dei contenuti**

### **1. Introduzione**

### **2. Breve focus sulla biologia dell'ozono**

### **3. O<sub>3</sub> nel rapporto tra stress ossidativo-infiammazione-coagulazione**

*3.1 L'azione sul percorso Nrf2/Keap1/ARE e il signaling dell' NF-κB*

*3.2 Proprietà anti-infiammatorie dell' O<sub>3</sub> attraverso I mediatori ossidati e l'evidenza della ricerca*

*3.3 Proprietà anti-infiammatoria ed anti-trombotica dell'O<sub>3</sub>: ruolo di HO-1, HIF-1α*

*3.4 Proprietà anti-infiammatoria dell' O<sub>3</sub>: alcune recenti scoperte sulle cellule immuni*

### **4. Il ruolo dell'ozono nella coagulazione e nei meccanismi trombotici**

### **5. Conclusioni**

## **Riferimenti bibliografici**

### **1. Introduzione**

L'ozono (O<sub>3</sub>) è una molecola instabile, un allotropo chimico dell'O<sub>2</sub>, che è stato recentemente utilizzato in una miscela standardizzata con ossigeno per trattare con successo la COVID-19 insieme alla consueta farmacologia anti-infiammatoria [1-11], rappresentando così un possibile approccio incoraggiante per affrontare la COVID-19 [12]. Ad oggi, i meccanismi molecolari con cui l'O<sub>3</sub> è in grado di agire contro la COVID-19 sono ancora lontani da essere completamente chiariti, sebbene recentemente siano stati riportati diversi tentativi su come l'O<sub>3</sub> potrebbe funzionare nei sistemi biologici [13-19]. Sebbene l'O<sub>3</sub> possa facilmente rimuovere il SARS-CoV2 dalle superfici inerti, un'evidenza che ne valuta il ben noto potenziale virucida [20-23], l'attività dell'O<sub>3</sub> nell'organismo umano è radicalmente diversa rispetto all'O<sub>3</sub> gassoso utilizzato per la disinfezione ambientale. È un dato di fatto, nonostante alcune prove riportate che dimostrano l'uso diretto pro-ossidante di O<sub>3</sub> contro le infezioni microbiche [24], che l'O<sub>3</sub> medicale di solito ostacola la diffusione del virus tramite mediatori generati dall'O<sub>3</sub>, come i derivati lipidici (aldeidi e ossisteroli), che sono potenti inibitori della SARS-CoV2 [25-27]. Più in generale, quando si parla di O<sub>3</sub> in medicina, dovrebbe essere obbligatorio distinguere un "O<sub>3</sub> inquinante nell'aria", solitamente tossico e che può interagire direttamente con gli epitelii delle vie aeree, da un "O<sub>3</sub> gassoso medico", che di solito viene somministrato in una miscela bilanciata O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> tramite autoemoterapia o insufflazione rettale o, in animali da laboratorio, anche come iniezione peritoneale [28].

La lunga storia dell'O<sub>3</sub> in medicina, usato per trattare un'ampia pletora di malattie, risale al 1915 dal dottor Walls e ha gradatamente ridotto la sua caratteristica empirica e pionieristica per raggiungere

un'eccellente e diretta esperienza nell'impiego con successo di O<sub>3</sub>, anche in pazienti cronici e nei disturbi degenerativi [29-34].

Molto recentemente, Franzini et al., utilizzando l'autoemoterapia O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>-AHT), sono riusciti a ridurre significativamente il ricovero in unità di terapia intensiva (ICU) di 50 pazienti maschi (età media 75 anni ± 11,4 DS), da una mediana da 22,13 ± 3,44 giorni a 13,45 ± 2,33 giorni (riduzione del 41%), un effetto probabilmente dovuto all'effetto concomitante di O<sub>3</sub> sul protocollo terapeutico solitamente raccomandato per COVID-19 [3]. Molti altri gruppi di ricerca stanno confermando questi risultati, sebbene con protocolli differenti. La Tabella 1 riassume le prove più recenti nell'uso dell'O<sub>3</sub> per il trattamento del COVID-19. Nonostante i numerosi sforzi per valutare il ruolo dell'O<sub>3</sub> nella riduzione dell'infiammazione e dei meccanismi pro-trombotici, la scarsità di documenti clinici esercita un impatto rilevante sulla dimensione dell'effetto quando i principali parametri riportati in quei documenti vengono raccolti per l'indagine meta-analitica. La Tabella 1 riporta le statistiche relative alla potenza dell'effetto per IL-6 e PCR (come principali marcatori di infiammazione) e D-dimero (come un marcatore principale di eventi trombotici), risultando che l'infiammazione è ridotta dell'80% (p <0,05) e considerando che la trombosi è ridotta del 50% (p > 0,05), tuttavia questi dati devono essere ulteriormente valutati. Questa supervisione ha l'obiettivo di raccogliere la maggior parte delle prove riguardanti la capacità dell'O<sub>3</sub> di ridurre l'infiammazione e gli eventi pro-trombotici, in tutta la letteratura sugli ultimi 30 anni, al fine di fornire approfondimenti su come l'ozono possa esercitare la sua azione positiva su COVID- 19 pazienti, attualmente emergenti nelle relazioni cliniche.

## **2. Breve focus sulla biologia dell'ozono**

Il successo clinico suggerisce che il ruolo dell'O<sub>3</sub> nella fisiologia umana può essere molto più importante del previsto, poiché l'O<sub>3</sub>, o almeno i suoi principali sottoprodotti ossidativi, sono fisiologicamente presenti nell'organismo. È un dato di fatto che lavori precedenti abbiano affrontato l'ipotesi intrigante che le cellule immunitarie naturali, come i neutrofili, possano produrre ozono biologico [35-37], sebbene siano state sollevate anche opinioni controverse su ciò [38,39]. Tuttavia, studi recenti hanno riportato che l'esposizione di amminoacidi o anticorpi all'ossigeno singoletto può formare ozono biologico [40]. I radicali dell'ossigeno e l'O<sub>3</sub> sono quindi sottoprodotti frequenti dei numerosi processi ossidativi che coinvolgono le biomolecole. Questa evidenza dovrebbe suggerire che l'O<sub>3</sub> possa funzionare più frequentemente come una molecola biologica interna, piuttosto che come uno xenobiotico chimico, probabilmente agendo come un commutatore chimico della complessa interazione creata dalla risposta allo stress ossidativo, dall'immunità e persino dalla fisiologia vascolare. Come vedremo più avanti, l'O<sub>3</sub> non solo è in grado di modulare lo stress

ossidativo, che è considerato un fattore causale principale in COVID-19 [41], ma anche di funzionare come un regolatore principale del complesso dialogo incrociato tra stress ossidativo e infiammazione, compresa la coagulazione del sangue e la fisiologia endoteliale. Prove recenti hanno riportato che durante la COVID-19, i geni coinvolti nella risposta allo stress, come TRAP-1 (che esprime la proteina da shock termico 75, hsp75) e NOX (che esprime le NADPH ossidasi) sono deregolati, insieme a SAE (che codifica per la proteina di SUMOilazione), VAV1 (implicato nelle funzioni piastriniche e nella coagulazione del sangue) [42] e l'espressione di diverse proteasi della catepsina [43]. Lo scenario patogenetico in cui l'O<sub>3</sub> dovrebbe funzionare può essere riassunto come segue. SARS-CoV2 induce una robusta risposta all'interferone di tipo I / III tramite l'attivazione dell'immunità innata, infiammazione e, successivamente, immunità adattativa, ma la disregolazione del sistema renina / angiotensina causata dal disturbo della segnalazione dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2), infine porta a stress ossidativo, quindi danni ai tessuti e un diffuso innesco della cascata della coagulazione che causa la coagulazione intravascolare disseminata (CID) e infine la trombosi [44]. Stress ossidativo, infiammazione e disturbi della coagulazione sono strettamente intrecciati nella patogenesi di COVID-19 e questi possono rappresentare obiettivi fondamentali per la terapia mediata da O<sub>3</sub>.

Tuttavia, da un punto di vista farmacologico, l'O<sub>3</sub> è ampiamente considerato una semplice molecola pleiotropica. Dovrebbe essere in grado, quindi, di indirizzare fundamentalmente il complesso macchinario cellulare coinvolto nella risposta allo stress ossidativo e quindi di agire in modo piuttosto aspecifico sulla modulazione immunitaria, ma a seconda della diversa esposizione a O<sub>3</sub>, dei dosaggi e delle condizioni sperimentali [45-48]. Come introdotto in precedenza, l'O<sub>3</sub> medicale di solito utilizza questo gas in una miscela ossigeno-ozono iniettata tramite emotrasfusione autologa e non deve essere confusa con l'O<sub>3</sub> disperso nell'aria proveniente dall'inquinamento ambientale, che può essere tossico per gli organismi se associato all'esposizione a lungo termine e alla presenza di ulteriori inquinanti come NO<sub>2</sub> e particolato [49,50]. L'ozono è tossico se inalato direttamente, anche in concentrazioni relativamente moderate [51], quindi questo modo di assunzione non viene mai considerato in un approccio terapeutico. Nonostante sia un tossico chimico, l'O<sub>3</sub> esercita la sua azione benefica a seconda del suo dosaggio, protocollo terapeutico, microambiente biologico e fattori genetici o epigenetici, che risultano essere fondamentali nello sviluppo e nella patogenesi del COVID-19 [52]. Questo effetto benefico è esercitato principalmente dai sottoprodotti derivati dal sangue. Sugli epitelii delle vie aeree e polmonari, l'O<sub>3</sub> gassoso è spesso nocivo perché danneggia la proteina B del surfattante polmonare (SPB), causando distress respiratorio [53]. SPB fa parte di un gruppo di proteine, presenti esclusivamente negli epitelii polmonari, con attività antimicrobica (SPA

e SPD) o che interagisce con i fosfolipidi, come la di-palmitoil fosfatidilcolina (DPPC) per garantire un film tensioattivo di aria/acqua e prevenire il collasso polmonare [54].

Come allotropo dell'ossigeno, l'O<sub>3</sub> è particolarmente instabile in soluzioni acquose, come il plasma del sangue circolante [55,56], probabilmente perché l'O<sub>3</sub>, o il suo principale sottoprodotto ossidativo, il radicale OH \*, viene rapidamente spento da antiossidanti come il gruppo cisteinile nelle proteine, l'acido urico, l'acido ascorbico, il glutathione ridotto (GSH) o anche l'albumina [57]. Quando iniettato nel sangue, l'O<sub>3</sub> può reagire con acidi grassi polinsaturi (PUFA), generando perossido di idrogeno [58], che è prodotto anche dall'interazione di O<sub>3</sub> con molecole contenenti gruppi aldeidici, formando quindi prodotti di ossidazione lipidica (LOP). Uno di questi prodotti è il 4-idrossinonenale (4-HNE) [58], che è una potente molecola bioattiva, come dimostrato da precedenti lavori che mostrano che il 4-HNE imita l'O<sub>3</sub> nell'indurre una modulazione della funzione dei macrofagi ex vivo [59]. I sottoprodotti generati dall'O<sub>3</sub> potrebbero funzionare come molecole di segnalazione in quei meccanismi che dimostrano l'effetto immunomodulatore dell'O<sub>3</sub>. Poiché l'O<sub>3</sub> può interagire almeno teoricamente con qualsiasi molecola organica, la sua capacità di generare mediatori bioattivi, come i LOP, consente a questa molecola di regolare finemente la complessa interazione tra stress ossidativo e infiammazione, prendendo di mira molti attori coinvolti nel cross talk plasma-endotelio del sistema vascolare, promuovendo probabilmente effetti antitrombotici anche su pazienti COVID-19 [1-3].

### **3. O<sub>3</sub> nel rapporto tra stress ossidativo-infiammazione-coagulazione**

#### *3.1 L'azione sul percorso Nrf2/Keap1/ARE e il signaling dell' NF-κB*

La compromissione dell'asse antiossidante / infiammatorio, esercitata dall'interazione Nrf2 / NF-κB, può essere una delle principali cause di gravi riacutizzazioni in COVID-19 [60]. L'O<sub>3</sub>, generando specie funzionali attive, dovrebbe essere considerato uno strumento promettente per il trattamento di pazienti con COVID-19, anche su un protocollo farmacologico concordato [61]. Tuttavia, questa prospettiva deve essere ulteriormente valutata chiarendo ulteriormente i meccanismi di azione dell'O<sub>3</sub> che si verificano per contrastare la patogenesi del COVID-19.

Cuadrado et al., si sono chiesti recentemente se l'attivazione del fattore nucleare 2-simile 2 di derivazione eritroide (Nrf2) possa essere una strategia di successo contro SARS-CoV2 [62]. Essendo un fattore di trascrizione genica, Nrf2 controlla l'espressione mediata dallo stress di un'ampia gamma di geni dipendenti dall'elemento di risposta antiossidante (ARE), principalmente coinvolti nello scavenging delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS) [63] . L'attività di Nrf2 viene attivata per ridurre anche un eccesso di stress ossidativo, mentre gli attivatori di Nrf2 possono essere utilizzati per rispondere farmacologicamente allo stress ossidativo

stesso. Ad esempio, l'attivatore Nrf2 sintetico, RTA-408, sopprime, attivando Nrf2, l'eccesso di produzione di ROS a seguito di una lesione, inibendo anche le cellule  $\gamma\delta$ Th17 [64]. Nrf2 funziona quindi come un importante interruttore nella risposta antiossidante a seguito di una lesione ossidativa. Lo stress ossidativo fornisce un contributo fondamentale nello sviluppo e nell'esacerbazione di COVID-19 [41]. Ciò incoraggia i ricercatori a cercare nuovi suggerimenti terapeutici, prendendo di mira Nrf2 per trattare COVID-19 [65]. Nrf2 è collegato nel citoplasma con la proteina 1 associata a Kelch like-ECH (Keap1) e con Cullin-3, che può degradare Nrf2 tramite ubiquitinazione, poiché Cullin-3 ubiquitina Nrf2 e Keap-1 promuove questa reazione legandosi al dominio Neh2 ammino-terminale conservato di Nrf2 [66]. I mammiferi sono dotati di diverse centinaia di geni guidati dall'ARE. La regione genetica contenente la sequenza 5'-A / GTGAC / TnnnGCA / G-3' è la box centrale di un elemento ad azione *cis* che regola l'ARE [67]. Molte molecole derivate dallo stress ossidativo, tra cui O<sub>3</sub> e suoi mediatori ossidati, come il radicale idrossile (OH<sup>-</sup>), il monossido di carbonio (CO), l'ossido nitrico (NO), il perossinitrito (ONOO<sup>-</sup>), l'acido perossintoso (ONOOH) e l'ipoclorito (HOCl), può attivare direttamente l'espressione genica ARE-dipendente [68]. Inoltre, Nrf2 è un componente della famiglia "cap 'n collar" (CNC), che raccoglie almeno sei fattori nei mammiferi, cioè p45, Bach1, Bach2, Nrf1, Nrf2 e Nrf3, che rappresentano la sottofamiglia NF-E2, che forma dimeri attivi in grado di potenziare o inibire l'espressione genica ARE-dipendente [68].

Studi recenti hanno dimostrato che O<sub>3</sub> attiva Nrf2 in maniera dose-dipendente [69,70]. In realtà, diversi lavori hanno dimostrato la capacità dell'O<sub>3</sub> medicale di ridurre lo stress ossidativo [71-73] ma anche di modulare l'interazione Nrf2 /NF- $\kappa$ B, probabilmente influenzando il tasso di espressione di IL-6/IL-1 $\beta$  in COVID-19 [72,73]. Inoltre, NF- $\kappa$ B interagisce, tramite p65, con Keap1, reprimendo così la via Nrf2-ARE [74]. O<sub>3</sub> attiva Nrf2 e inibisce la via NF- $\kappa$ B [69,75], mostrando quindi proprietà antiossidanti e antinfiammatorie [76]. Questa capacità è posseduta anche dalle lipoproteine a bassa densità ozonizzate (ozLDLs), che possono inibire NF- $\kappa$ B attraverso la down-regulation della segnalazione associata all'IRAK-1 [77]. Pertanto, l'O<sub>3</sub> medicale nel plasma può generare ozLDL, che inducono una diminuzione della proteolisi di I $\kappa$ B $\alpha$ , riduzione della trascrizione genica  $\kappa$ B-dipendente e della fosforilazione e proteolisi della chinasi 1 associata al recettore IL-1 (IRAK-1), innescando così una via anti-infiammatoria [77]. L'interazione chimica dell'O<sub>3</sub> con il sangue periferico, che dovrebbe avvenire durante il suo uso medico tramite l'O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>-AHT [1-3], genera un'enorme quantità di mediatori biochimici, che probabilmente lavorano sull'interazione Nrf2 / NF- $\kappa$ B tramite un meccanismo ormetico dose-risposta [78].

Il concetto di "ormesi", riportato per la prima volta da Calabrese e Baldwin nel 1998 [79], che è stato recentemente associato al concetto di "stress lieve" o "eustress" [69], è stato introdotto per O<sub>3</sub>

da Bocci e colleghi, a evidenziare l'effetto benefico di dosi relativamente basse (o bassa esposizione) di O<sub>3</sub>, che solitamente, a dosi elevate, è una molecola pro-ossidante e potenzialmente tossica [78]. È interessante notare che, allo stesso modo, molti xenobiotici inducono benefici da un meccanismo ormetico [78-81], l'O<sub>3</sub> interagisce con i recettori degli idrocarburi arilici (Ahr), controllando l'infiammazione polmonare modulando la segnalazione mediata da IL-22 [82], un modo utilizzato anche da fitochimici derivati dalle piante, per indurre una risposta antinfiammatoria [83]. Secondo alcuni autori, l'ipotesi per cui O<sub>3</sub> induca l'attivazione della via Nrf2, potrebbe comportare l'insorgenza di un lieve stress ossidativo, in grado di suscitare l'espressione della dotazione antiossidante della cellula, senza provocare lesioni da stress [84, 85].

La risposta allo stress ossidativo è un meccanismo precoce che modula l'immunità e in realtà la via Nrf2 / Keap1 / ARE è di grande importanza nell'infiammazione [86,87], in particolare in COVID-19 [65].

È un dato di fatto, e prove recenti lo hanno riportato, che SARS-CoV2 smorza l'attività di segnalazione Nrf2, poiché l'espressione mediata dalla via Nrf2 dei geni antiossidanti è soppressa nelle biopsie di pazienti con COVID-19 [88]. Lavori recenti hanno dimostrato che l'analisi del trascrittoma delle biopsie polmonari di pazienti con COVID-19 ha mostrato un arricchimento nell'espressione dei geni associati all'infiammazione, come i recettori Toll-like (TLR) e i recettori RIG-I like RIG-I, MDA -5 e LGP2, mentre è stata osservata una forte riduzione dei geni associati a Nrf2 [88]. L'attivazione della segnalazione mediata da Nrf2 appare quindi farmacologicamente strategica nel trattamento da COVID-19. Inoltre, le cellule producono molecole in grado di innescare la via mediata da Nrf2, come il fumarato e l'itaconato [88]. Mentre il fumarato è un comune intermedio del ciclo del citrato e dell'urea, l'itaconato è prodotto dall'aconitato decarbossilasi I nei mitocondri dei macrofagi, di solito su stimoli infiammatori o xenobiotici. Dopo l'alchilazione Keap 1, itaconato induce una risposta mediata da Nrf2 [89]. Inoltre, durante una malattia polmonare cronica si verifica una riprogrammazione metabolica dei macrofagi delle vie aeree, poiché queste cellule immunitarie innate utilizzano la segnalazione ROS per produrre itaconato, che fondamentalemente è in grado di abbattere l'infezione batterica, come quella da *P aeruginosa*, inibendo l'isocitrato liasi microbico nello shunt del glicossilato [90,91]. L'itaconato nei macrofagi delle vie aeree è una delle principali molecole antimicrobiche e la sua produzione è attivata dalla segnalazione dei ROS, probabilmente da molecole in grado di innescare una risposta allo stress ossidativo come l'O<sub>3</sub> e i suoi mediatori [92]. Molti di questi mediatori sono prodotti dall'O<sub>3</sub> nel sangue.

### *3.2 Proprietà antinfiammatorie dell'O3 tramite mediatori ossidati e prove di ricerca*

I macrofagi esprimono altamente due recettori fondamentali, cioè la proteina legante l'elemento recettore degli steroli (SREBP) e il recettore X del fegato alfa ( $LXR\alpha$ ), che regolano la risposta cellulare e il rilascio di citochine [93,94]. Il ruolo di SREBP è fondamentale perché è aumentato, tramite il segnale NF- $\kappa$ B, da una via mediata dall'inflammasoma nei macrofagi infiammatori M1-pro, mentre il fenotipo anti-infiammatorio M2 è attivato da una via mediata da  $LXR\alpha$  [92]. L'O3 nel sangue è in grado di produrre una grande quantità di prodotti lipidici ossidati (LOP), e l'O3 stesso può avere un ruolo importante nel modulare la risposta delle cellule immunitarie innate e la commutazione del fenotipo M1 / M2 dei macrofagi [96]. Il colesterolo può essere ossidato dall'O3 e dai suoi radicali ossidanti nel sangue, formando prodotti generalmente noti come ossisteroli, che possono interagire con  $LXR\alpha$  [97]. Gli oxysterols includono un'ampia famiglia di sottoprodotti del colesterolo ossidato, che esercitano un ruolo immunomodulatore [98]. Nel polmone, gli ossisteroli derivati dall'O3 esercitano principalmente un'attività pro-infiammatoria poiché interagiscono in modo del tutto esclusivo con la segnalazione pro-infiammatoria mediata da SREBP nelle cellule di tipo II delle vie aeree, a causa della presenza di proteine tensioattive [99,100]. Nel sangue, l'O3 può generare diversi mediatori derivati dai lipidi, oltre a specie radicaliche derivate dall'ossigeno e dall'azoto, anche da acidi grassi polinsaturi (PUFA), inclusi gli ossisteroli che interagiscono con  $LXR\alpha$  [101-103]. Secondo Bocci, la "finestra terapeutica" per O3 potrebbe variare da 0,21  $\mu$ mol / ml (10  $\mu$ g / ml O3 per ogni ml di sangue) a 1,68  $\mu$ mol / ml (80  $\mu$ g / ml O3 per ogni ml di sangue), come in in questo intervallo di dosaggio il sistema antiossidante è in grado di neutralizzare l'O3 e di mantenerne il beneficio biologico, mentre dosi più elevate sono indubbiamente tossiche, seguendo la paradossale farmacologia a forma di U dell'ormesi [104]. Oltre al ROS, l'O3 può produrre specie elettrofile reattive (RES), come aldeidi  $\alpha$ ,  $\beta$ -insature da PUFA e interessante, almeno dal punto di vista funzionale, anche itaconato è una RES, essendo in grado di attivare i macrofagi nel rispondere stress tramite mitomeresi, meccanismo suggerito anche per l'O3 [78,105,106].

L'ossidazione di lipidi come gli acidi arachidonico e linoleico da parte dell'O3 può formare idrossialken  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturi [78,107], come lo stesso 4-idrossi-2-nonenale (4-HNE), che ha un ruolo di primo piano nell'azione anti- risposta ossidativa tramite Nrf2 anche nelle cellule polmonari umane [108,109]. In realtà, il contatto relativamente breve di O3 con il sangue, durante un O2-O3-AHT, consente all'O3 di reagire con  $\omega$ -3 PUFA, formando idrossil-esaenale (HHE) o con  $\omega$ -6 PUFA formando 4-HNE [110]. Quest'ultimo, abilitando addotti chimici con residui di Cys-34 nell'albumina, può innescare, in concentrazioni picomolari, una risposta allo stress mediato da Nrf2 ossidativo [110]. La letteratura sul 4-HNE descrive questo sottoprodotto della perossidazione lipidica come un induttore di stress ossidativo, quindi coinvolto in diversi disturbi indotti da



ossidanti, nonostante l'evidenza che, a basse dosi, il 4-HNE eserciti un'azione benefica, antiossidante e citoprotettiva tramite l'induzione della tioredossina riduttasi 1 dall'attivazione di Nrf2 [111]. Il ruolo antiossidante e antinfiammatorio del 4-HNE è stato recentemente rivisto [112]. Basse dosi di 4-HNE (5-10  $\mu\text{mL} / \text{L}$ ) aumentano l'espressione dell'eme ossigenasi-1 (HO-1), contribuendo all'endotelio protettivo e alla fisiologia vascolare [113].

L'attività biologica dell'O<sub>3</sub> è mediata principalmente da ossisteroli derivati dal colesterolo, elettrofili come  $\alpha$ , aldeidi  $\beta$ -insaturi da PUFA e residui di cisteinile modificato (Cys) nelle proteine. Nessuno di questi sottoprodotti è di per sé benefico, essendo, come altri prodotti finali ossidati, tossico ad alte concentrazioni. Tuttavia, possono innescare, come molecole di segnalazione, l'espressione di geni citoprotettivi e di sopravvivenza [114]. RES come 4-idrossi-2-esenale, 4-HNE, 15d- $\Delta$ 12,14-PGJ<sub>2</sub>, inducono una risposta adattativa cellulare in quanto possono interrompere il complesso Nrf2-Keap1 tramite la modifica di Cys273 e Cys288 di almeno 25 Cys residui in Keap-1, attivando quindi Nrf2 [115]. In realtà, la capacità di O<sub>3</sub> di interagire con i residui di cisteinile, può sintonizzare l'attività dei residui di Cys strategici nella funzione Keap1. Tre principali sensori di cisteina sono stati segnalati nel coinvolgimento di Keap1 nella risposta allo stress, vale a dire Cys151, Cys273 e Cys288, che funzionano come sensori di stress per attivare il meccanismo antiossidante mediato da Nrf2 [116,117].

La modifica chimica esercitata dall'O<sub>3</sub> sui residui Cys cruciali di Keap-1 nei loro gruppi tiolici, dovrebbe inibire lo spegnimento di Nrf2 da parte di Keap1, prolungando così la risposta allo stress ossidativo da parte di O<sub>3</sub> [110]. L'interazione dell'O<sub>3</sub> con il sangue, che forma importanti metaboliti in grado di innescare una risposta antiossidante a basse dosi, dovrebbe essere un tema cruciale da approfondire e approfondire in farmacologia [118].

Nei fibroblasti sinoviali purificati dall'artrite reumatoide, il 3-5% v / v di O<sub>3</sub> gassoso ha ridotto l'espressione cellulare di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 [119], citochine pro-infiammatorie che partecipano attivamente alla patogenesi COVID-19 [120]. I metaboliti derivati dall'O<sub>3</sub> come 4-HNE, sono in grado di inibire la produzione di IL-6 nei macrofagi epatici agendo su NF- $\kappa$ B, cioè prevenendone l'attivazione e sopprimendo la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  [121], e degno di nota il 4-HNE inibisce entrambi i TNF espressione di - $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nella linea cellulare monocitica umana THP-1 in risposta a LPS [122].

### *3.3 Proprietà antinfiammatorie e antitrombogeneiche dell'O<sub>3</sub>: ruolo di HO-1, HIF-1 $\alpha$*

Come descritto in precedenza, l'O<sub>3</sub> può attivare una risposta antiossidante tramite la via Nrf2 / Keap-1 / ARE o inducendo una segnalazione mediata da ROS da prodotti lipidici ossidati, come ossisteroli e aldeidi  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturi da PUFA o stimolando altri mediatori come l'eme ossigenasi-1

(HO-1) [123]. Sia O<sub>3</sub> che 4-HNE inducono la produzione di HO-1, collegando il cross talk Nrf2 / NF-κB con la fisiologia e la coagulazione dell'endotelio [113,123]. Lo stress ossidativo è stato suggerito come un problema principale nella patogenesi da COVID-19 [124,125], quindi qualsiasi strategia farmacologica per smorzare lo stress ossidativo nei soggetti infetti da SARS-CoV2 è della massima importanza. In questo contesto, alcuni autori hanno suggerito che il targeting HO-1 potrebbe essere un passo promettente nel controllo dell'infezione da SARS-CoV2 e nell'affrontare un trattamento COVID-19 di successo [126]. L'eme ossigenasi, cioè l'eme ossigenasi 1 (HO-1) e l'eme ossigenasi 2 (HO-2), non solo degradano l'eme fisiologico rilasciando quindi CO, biliverdina e ferro, ma agiscono come sensori di ossigeno durante l'ipossia [127]. In realtà, una delle principali cause di riacutizzazione di COVID-19, spesso associata a comorbilità come l'obesità, è l'ipossia [128]. L'obesità, che è una delle principali comorbilità nel COVID-19, può aumentare la produzione del fattore-1α inducibile dall'ipossia (HIF-1α), spostando una tempesta di citochine in corso in un evento fulminante [128].

Poiché HO-1 è uno dei geni espressi dall'attivazione della via Nrf2 / Keap1 / ARE ed è un importante sensore del livello di O<sub>2</sub> nel sangue, la sua induzione da parte di O<sub>3</sub> e dei suoi può essere particolarmente cruciale per trattare con successo i pazienti COVID-19. Le cellule dei mammiferi devono regolare i loro livelli di ossigeno al giusto equilibrio omeostatico. In questo senso, HIF-1α è un sensore di ossigeno molecolare, una subunità del fattore di trascrizione del gene eterodimerico HIF-1 insieme a HIF-1β, e comprende gli analoghi HIF-2α e HIF-3α [129]. Come Nrf2, anche HIF-1α ha un motivo di legame al DNA, chiamato elemento di risposta all'ipossia (HRE) [130]. Il ruolo di O<sub>3</sub> nei confronti di HIF-1α è stato recentemente affrontato in animali da esperimento con nefropatia diabetica, con conseguente diminuzione del segnale apoptotico inibendo l'espressione delle caspasi 1,3 e 9 e modulando l'attività di HIF-1α [131]. Fondamentalmente O<sub>3</sub> sembra inibire l'espressione di HIF-1α [132], riducendo così lo stimolo ipossico. Inoltre, l'interazione Nrf2-NF-κB con HO-1, regola l'espressione della molecola di adesione cellulare vascolare-1 (VCAM-1), inibendone l'espressione, che è normalmente up-regolata in COVID-19 [133,134].

Si può descrivere una complessa rete funzionale inter-correlata che coinvolge il cross talk Nrf2 / NF-κB nell'attività delle dosi ormetiche di O<sub>3</sub> e dei suoi derivati nel sangue [73]. Nel sangue O<sub>3</sub> può formare ROS dall'acqua, specie reattive dell'azoto (RNS) dall'azoto ossidato e RES da lipoproteine, lipidi di membrana e altri derivati PUFA come il 15-deossi-Δ12,14-PGJ2 [135, 136]. Questi sottoprodotti innescano un meccanismo antiossidante tramite l'attivazione Nrf2 / Keap1 / ARE, inibendo così il meccanismo pro-infiammatorio guidato dalla via NF-κB. Inoltre, l'interazione di RES con i residui di Cys in Keap1, riduce la degradazione dipendente dal proteasoma di Nrf2, migliorando il suo stato attivato e inibendo le vie apoptotiche, sia la segnalazione FAS / TNFR /

caspiasi 8 che l'apoptosi mediata dai mitocondri e inducono l'attivazione dei geni di sopravvivenza [137]. In breve, l'attivazione di un meccanismo antiossidante tramite Nrf2 induce un'inibizione del meccanismo pro-infiammatorio che sopprime l'attivazione di NF- $\kappa$ B. Inoltre, l'attivazione di NRF2 / Keap1 / ARE innesca la produzione di HO-1, che è indotta direttamente dall'O<sub>3</sub> e inibisce la trombosi piastrinica [138-141].

La Figura 1 riassume questa panoramica.

Inoltre, la percentuale di saturazione dell'ossigeno (SatO<sub>2</sub>%) così come altri parametri della funzione polmonare come il rapporto tra pressione arteriosa dell'ossigeno sulla frazione inspirata di ossigeno (PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub>), sono marcatori fondamentali nella patologia da COVID-19, quindi mediatori dell'omeostasi dell'ossigeno sono possibili bersagli dell'O<sub>3</sub> medicale nella terapia della COVID-19. Quando sono presenti livelli normali e fisiologici di ossigeno, la subunità alfa di HIF-1 viene idrossilata su specifici residui Pro nel dominio di degradazione dipendente dall'O<sub>2</sub> dalle proteine contenenti il dominio prolil-idrossilasi (PHD). La forma idrossilata HIF-1 $\alpha$  è riconosciuta dalla proteina di von Hippel-Landau, quindi bersaglia HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$  per l'ubiquitinazione e la degradazione da parte del proteasoma 26S [142]. Con bassi livelli di ossigeno HIF-1 $\alpha$  non può essere degradato più a lungo, a causa della compromissione dell'attivazione dei PHD, accumulando HIF-1 $\alpha$ , che viene traslocato nel nucleo dove attiva i geni HRE-dipendenti, come i recettori di morte della famiglia TNF che inducono l'apoptosi [142]. In questo senso, la riduzione del livello di HIF-1 $\alpha$  da parte di O<sub>3</sub> può essere spiegata come un'azione di contrasto per ridurre il segnale pro-infiammatorio e pro-apoptotico guidato dall'HIF-1 $\alpha$  sugli HRE. Lavori recenti hanno delineato un importante dialogo incrociato tra la via HIF-1 $\alpha$  e la segnalazione Nrf2, suggerendo che il ruolo di O<sub>3</sub> in questo contesto può essere sintonizzabile e intrecciato con la segnalazione Nrf2 / Keap1 / ARE [142,143]. Durante gli stimoli ipossiemici causati dalla polmonite associata a COVID-19, il ruolo di HIF-1 $\alpha$  appare particolarmente intrigante, perché HIF-1 $\alpha$  up-regola i recettori ACE-1, riducendo quindi l'espressione di ACE-2. Poiché in condizioni fisiologiche esiste un equilibrio tra i recettori ACE-1 / ACE-2, HIF-1 $\alpha$  riduce quindi la diffusione della SARS-COV2 nell'organismo [144]. La stabilizzazione di HIF-1 $\alpha$  è quindi considerata fondamentale per smorzare l'infezione da SARS-CoV2 [144] e HO-1 stabilizza HIF-1 $\alpha$ , proteggendo l'organismo dal danno da ischemia-riperfusionazione [145]. Inoltre, HIF-1 $\alpha$ , in condizioni di lieve stress, promuove l'espressione di HO-1, potenziando i meccanismi di protezione antitrombotica e cardiovascolare [146]. Un basso livello di ossigeno promuove la replicazione di SARS-CoV2 [147]. In questo senso, il ruolo dell'O<sub>3</sub> nel ripristinare la disponibilità ottimale di ossigeno può essere cruciale anche nel ridurre la diffusione virale in più organi e tessuti. A questo proposito, indagini precedenti hanno riportato che O<sub>3</sub>, a contatto con sangue umano, è in grado di provocare una notevole

sovraregolazione di HO-1. La percentuale di aumento di HO-1 è stata + 132% (come bilirubina, pmol / mg di proteine cellulari / 1 ora su HUVEC trattata con 40 µg / ml O<sub>3</sub> in una miscela O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> nel plasma), + 156% con 40 µg / ml O<sub>3</sub> e + 116% con 80 µg / ml O<sub>3</sub>, mostrando un possibile effetto ormetico [148].

Ciò dovrebbe enfatizzare il ruolo dell'O<sub>3</sub> nel contrastare lo stress ossidativo, l'infiammazione e i processi ischemico-trombogenici. In realtà, HO-1 è stato recentemente considerato un bersaglio farmaceutico per il trattamento del COVID-19 [149]. Durante l'infezione da SARS-CoV2 HO-1 aumenta nel sangue insieme a eme, anemia e desaturazione [150]. L'evidenza che riporta che O<sub>3</sub> può attivare HO-1 può rappresentare un approccio promettente per trattare COVID-19, per il quale il targeting HO-1 è una questione di crescente interesse [151,152]. HO-1 e Nrf2 svolgono un'interazione fondamentale nella risposta allo stress ossidativo, poiché HO-1 è un gene a valle regolato da Nrf2 [150], quindi si è tentati di ipotizzare che l'attività di O<sub>3</sub> su HO-1 possa essere indirettamente modulata da un effetto molto più diretto sul percorso Nrf2 / Keap-1 / ARE, come suggerito sopra.

### *3.4 Proprietà antinfiammatorie dell'O<sub>3</sub>: alcuni recenti approfondimenti sulle cellule immunitarie*

È fondamentale chiarire l'azione dell'O<sub>3</sub> e dei suoi derivati ROS e RES sulle cellule immunitarie, a causa del coinvolgimento dell'immunità in COVID-19 [153-155]. L'ozono modula l'espressione differenziale dei macrofagi M1 pro-infiammatori e M2 anti-infiammatori, partecipando quindi al loro equilibrio nei tessuti affetti da COVID-19 come le vie aeree e gli epiteli polmonari [95]. In un modello sperimentale di artrite reumatoide, O<sub>3</sub> ha ridotto il livello di TNF-α e IL-12 dalle cellule immunitarie sinoviali e ha aumentato la citochina antinfiammatoria IL-10 [156]. La proprietà antinfiammatoria dell'O<sub>3</sub> è più spesso esercitata dai suoi fosfolipidi ossidati, come il 4-HNE, che è un potente attivatore della sintesi di Nrf2 e HO-1, come riportato nelle cellule microgliali BV-2 [157].

L'effetto della terapia O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>, come in O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>-AHT, influisce notevolmente sull'omeostasi delle cellule regolatorie (Treg) CD4 + CD25 + Foxp3 + T, come riportato in un modello di sclerosi multipla. Recentemente è stato osservato un miglioramento significativo nelle cellule Treg, nei microRNA miR-17, miR-27, in IL-10 e TGF-β [158], salvando così la normale presenza di cellule Treg, poiché il loro numero si riduce durante COVID-19 [159]. L'uso di O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>-AHT è sicuro, come riportato dall'effetto trascurabile sulla funzione dei neutrofili [160]. Inoltre, pubblicazioni precedenti hanno mostrato l'azione immunoregolatrice dell'O<sub>3</sub> sui mastociti in vitro [161]. A causa del fondamentale coinvolgimento dei mastociti nella patogenesi del COVID-19 [162], questo problema dovrebbe essere particolarmente degno di ulteriori indagini.

Il ruolo dell'O<sub>3</sub> nell'abbattere o modulare la risposta infiammatoria grave che si verifica nel COVID-19 è particolarmente complesso e coinvolge una pletera di mediatori generati da O<sub>3</sub> nel sangue, che esercitano direttamente o indirettamente la loro azione sull'immunità innata e acquisita. Tuttavia, l'O<sub>3</sub> di per sé esercita un ruolo di primo piano nell'immunità, almeno in vitro. Notevolmente, il recente studio di Umut Kan Kucucsezer e colleghi, ha riportato che le cellule mononucleate del sangue periferico (PBM), ritirate da donatori sani, quando trattate con O<sub>3</sub> medicale a dosi da 1,0 µg / ml a 50 µg / ml, non hanno mostrato citotossicità alle dosi più basse (<10 µg / ml), valutando che l'esposizione diretta con O<sub>3</sub> gassoso ad alta concentrazione può essere tossica ma, al contrario, basse dosi di O<sub>3</sub> stimolano lo sviluppo delle cellule CD3-, CD16 + -CD56 + NK e l'espressione del marker CD107a in quelle cellule, valutando così un'azione immunomodulatrice e antinfiammatoria innescata da basse dosi di O<sub>3</sub>, un probabile indizio del principio ormetico [163-165].

L'evidenza che l'O<sub>3</sub> modula l'immunità è stata riportata anche dalla sua attività antimicrobica, ad esempio contro *Klebsiella pneumoniae*, potenziando l'immunità innata e la produzione di MIP-2 e per la sua attività antiparassitaria in vivo [166]. Cabral e colleghi hanno dimostrato che 20 µg / ml (topico) o 30 µg / ml (intraperitoneale) di O<sub>3</sub> in topi BALB / c, precedentemente infettati con 1x10<sup>5</sup> promastigoti di *Leishmania amazonensis* (MHOM / BR / 1977 / LTB0016), hanno ridotto il numero di parassiti, aumentato il numero di leucociti e l'arginasi dei macrofagi M1 e ha innescato notevolmente i meccanismi di riparazione della ferita e la sintesi del collagene [167]. Inoltre, prove recenti hanno riportato che il recettore farnesoide (FXR) regola il passaggio dei macrofagi a un fenotipo antinfiammatorio in seguito all'esposizione a O<sub>3</sub>, come osservato nei topi (FXR - / -), dove uno stress ossidativo prolungato porta ad un incremento di NO causato da NF-κB e aumento dei livelli di TNF-α, IL-1β, CCR2, CL2, CC3CR1 e CC3L1 [168].

La stessa segnalazione Nrf2 / Keap-1 / ARE ha un ruolo di primo piano nella modulazione della tempesta di citochine, come sottolineato da alcuni autori che suggeriscono Nrf2 come un problema di targeting farmacologico [169]. In questa prospettiva, è ipotizzabile suggerire l'ipotesi che O<sub>3</sub> possa esercitare un importante effetto antinfiammatorio tramite l'attivazione della segnalazione Nrf2 / Keap-1 / ARE. In realtà, Nrf2 è in grado di sopprimere l'espressione di citochine pro-infiammatorie nei macrofagi, in particolare IL-6 e IL-1β, come riportato anche in recenti studi clinici dove l'O<sub>3</sub> medicale, usato per trattare persone anziane ricoverate in unità di terapia intensiva con COVID-19, ha notevolmente diminuito i livelli di IL-6 nel sangue [3,170]. L'inibizione dell'infiammazione da parte di O<sub>3</sub> riguarda quindi l'O<sub>3</sub> ematologico medicale nel decorso clinico di una malattia. Poiché l'O<sub>3</sub> è una sostanza altamente reattiva, il suo potenziale antinfiammatorio può

essere recuperato solo con protocolli appropriati e validi, poiché i tentativi empirici di solito non riescono a fornire risultati incoraggianti [171-173].

D'altra parte, la patogenesi immunitaria di COVID-19 appare particolarmente complessa. In questo senso, il contesto immunologico in cui l'O<sub>3</sub> opera per ridurre l'impatto immunitario del COVID-19 deve essere ulteriormente valutato, ad esempio evidenziando la diversa patogenesi del COVID-19 in vari individui. Le biopsie del tessuto polmonare *post mortem* nei pazienti COVID-19 hanno delineato diversi tipi di manifestazioni nel disturbo immunitario e nella disregolazione nota come "tempesta di citochine" e qualsiasi manifestazione condivideva un aumento delle citochine infiammatorie sistemiche, come IL-6 e uno stato pro-trombotico, esprimendo alti livelli di ICAM-1, e talvolta mostrando, nel tessuto polmonare, ficolina 3 (FCN3) nella membrana ialina, IL-1 e TNF- $\alpha$  e abbondanti mastociti / CD117+) o in alternativa una marcata risposta Th2, rappresentata da cellule CD8+ alte, IL-4, IL-13 e TGF- $\alpha$  tessuto-correlato [174].

Possono verificarsi almeno due diversi tipi di risposta immunitaria, un'immunità mediata da Th-1 o da Th-2. In questo contesto, l'O<sub>3</sub> può esercitare una complessa attività immunomodulante, solitamente tramite metaboliti bioattivi generati dall'O<sub>3</sub>, come 4-HNE, che possono avere un ruolo antinfiammatorio.

Almeno nei pazienti obesi e negli adipociti, è stato riportato che il 4-HNE regola l'espressione genetica del TNF- $\alpha$  tramite l'attivazione del fattore di trascrizione ETS1 e del microRNA miRNA29b [175].

Il ruolo del 4-HNE nel ridurre l'infiammazione, inibendo NF- $\kappa$ B, è ben noto [176], e inoltre il 4-HNE può inibire la produzione di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  da monociti attivati dall' LPS batterico, tramite l'inibizione della segnalazione di p38MAPK e ERK1 / ERK2 [177]. È possibile ipotizzare, quindi, che l'attività antinfiammatoria di O<sub>3</sub> in COVID-19, possa essere esercitata fondamentalmente da aldeidi derivate da lipidi ossidati da O<sub>3</sub> nelle cellule e nel sangue. Inoltre, si deve tenere in considerazione che le cellule immunitarie innate possono produrre O<sub>3</sub> endogeno, sebbene in condizioni particolari [36,178,179]. I mediatori lipidici endogeni causati da O<sub>3</sub> e l'O<sub>3</sub> stesso, sono potenti strumenti antinfiammatori. Le ciclo-pentenone isoprostani, che possono essere prodotti dalle interazioni di O<sub>3</sub> con i lipidi, sono forti inibitori della risposta infiammatoria nei macrofagi [180]. Alcuni ossisteroli, come il 25-idrossicolesterolo, hanno proprietà antinfiammatorie, essendo in grado di smorzare l'infiammazione mediata da IL-1, a valle dell'attivazione del TNF- $\alpha$  [181].

#### **4. Il ruolo dell'ozono nella coagulazione e nei meccanismi trombotici**

Finora, abbiamo delineato che il modo principale con cui O<sub>3</sub> agirebbe contro l'infezione da SARS-CoV2 e più esattamente nei confronti di COVID-19 riducendone l'impatto clinico, prevede

l'attivazione della dotazione antiossidante delle cellule infette, ovvero gli enzimi di scavenging e i fattori di trascrizione genica, probabilmente tramite un lieve stress, che a sua volta attiva la segnalazione ROS e innesca l'espressione di una risposta di sopravvivenza e antinfiammatoria [182]. Ciò può risultare una buona ipotesi, poiché diversi lavori hanno dimostrato la capacità di dosaggi piccoli o moderati di O<sub>3</sub> gassoso nel sangue di promuovere una risposta antiossidante nell'organismo, mirando fondamentalmente alla via Nrf2 / Keap-1 / ARE e all'espressione di HO-1. Inoltre, l'O<sub>3</sub> può colpire anche la via complessa ossido nitrico / ossido nitrico sintasi inducibile (NO/iNOS) [183]. La convinzione altamente diffusa che COVID-19 possa essere fondamentalmente una malattia endoteliale-pro-trombotica, come riportato dall'osservazione che NO, statine e ACE inibitori sono in grado di indurre una manifestazione meno grave di COVID-19, riducendo l'esacerbazione, mette attualmente in primo piano il ruolo dell'NO nel trattamento del COVID-19 [184].

È noto che l'NO viene rilasciato dall'endotelio per prevenire la trombosi mediata dalle piastrine e per ostacolare il reclutamento di nuove piastrine nella formazione di trombi [185]. Lavori recenti hanno mostrato che, stante l'esaurimento del GSH e gli stimoli ipossici, l'NO simula la produzione di HO-1 [186], una prova che rafforza il risultato che HO-1, il principale mediatore antitrombotico, viene rilasciato dall'attività antiossidante mediata da Nrf2 e da NO, che a sua volta dialoga con la segnalazione HIF-1 $\alpha$ . In realtà, mentre è riportato che livelli lievi di NO (solitamente  $\leq 400$  nmoli / L) promuovono la degradazione mediata dal proteasoma di HIF-1 $\alpha$ , alterando la segnalazione di HIF-1 $\alpha$ , alte dosi di NO ( $\geq 1,0$  moli / L) stabilizzano HIF-1 $\alpha$ , anche durante condizioni normossiche [187]. Si è tentati di ipotizzare che durante il COVID-19 un'interazione finemente regolata NO-HO-1-HIF-1 $\alpha$ , più che un gigantesco ammontare di O<sub>2</sub>, sia il meccanismo principale di prevenzione dei disturbi vascolari e della trombosi riportati nel COVID-19 grave.

La Tabella 2 riassume alcune delle principali evidenze sull'effetto dell'O<sub>3</sub> sui modelli di danno da ischemia / riperfusione in animali da laboratorio e in studi in vitro [187-196]. Oltre all'esacerbazione dello stato pro-ossidante e pro-infiammatorio, COVID-19 è caratterizzato da gravi disturbi del sistema endoteliale-coagulativo e pro-trombotico [197-201]. Il modello di lesione ischemia / riperfusione (I / R) rappresenta un banco sperimentale affidabile per indagare l'attività dell'O<sub>3</sub> e dei suoi mediatori sui processi vascolare-endoteliali e trombotici [202].

Studi pionieristici condotti da Rokitansky et al., nel 1981, hanno valutato il ruolo dell'O<sub>3</sub> nel modulare la produzione di 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), un fattore fondamentale per la funzione trombogenica piastrinica [78,203,204]. I fattori che migliorano l'ossigenazione del sangue influenzano molti meccanismi che coinvolgono la fisiologia dell'endotelio vascolare. Esiste un'azione sinergica tra l'attività Nrf2 e il ruolo di HO-1, in particolare nella funzione

cardiovascolare, pertanto l'attività antitrombotica e protettiva vascolare di HO-1 è potenziata da un loop sinergico positivo dall'azione mediata da O<sub>3</sub> su Nrf2 [205]. Diversi studi di ricerca, su animali da laboratorio, hanno dimostrato che la somministrazione di O<sub>3</sub> in modelli I / R, spesso riduceva l'impatto del danno mediato da I / R e innescando una risposta antiossidante. Tuttavia, la condizione e i dosaggi di O<sub>3</sub> utilizzati nei modelli I / R possono essere ampiamente limitanti, poiché O<sub>3</sub> esercita la sua azione in un sistema molto complesso. Elsurer et al., hanno sottoposto ratti Wistar maschi a legatura dell'arteria ascellare, causando ischemia per 3 ore e poi riperfusione per 24 ore. O<sub>3</sub> dopo la lesione ischemica è stato somministrato per via intraperitoneale (1,0 mg / kg, come una miscela di gas O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> 97% O<sub>2</sub> e 3% O<sub>3</sub>, 3 L min<sup>-1</sup>, con O<sub>3</sub> = 60 µg / ml). I ratti trattati con solo O<sub>3</sub> (senza I / R) hanno riportato solo l'8% di danni ai tessuti, rispetto al 17% di solo I / R e al 15% di ischemia + O<sub>3</sub> [191]. I ratti trattati con O<sub>3</sub> anche nel modello I / R, hanno mostrato un marcato aumento di MDA, proteina carbonile (PCO), capacità antiossidante totale (TAC), SOD, GSH-Px e catalasi [191]. Onal e colleghi hanno indotto una lesione I / R in ratti Wistar maschi occludendo l'arteria mesenterica superiore per 60 min (ischemia), seguita da 2 ore di riperfusione. Nel gruppo pretrattato con O<sub>3</sub>, utilizzando 3 L / min di una miscela di gas O<sub>2</sub> (97%) - O<sub>3</sub> (3%) con 60 µg / mL O<sub>3</sub>, volume 3,2-4,2 ml, gli animali hanno mostrato una diminuzione della lesione della mucosa intestinale e aumento della capacità antiossidante totale (TAC), SOD, glutatione perossidasi e catalasi [206].

Il ruolo dell'NO nei modelli di lesione I / R è supportato dall'osservazione che somministrando donatori di NO o composti in grado di aumentare la produzione di NO prima di indurre ischemia, il danno che segue I / R è notevolmente ridotto [207]. La miscela O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> utilizzata per iniettare O<sub>3</sub> nel sangue è in grado di attivare l'ossido nitrico endoteliale sintasi (eNOS) [208,209], pertanto il rilascio di NO è innescato direttamente dall'O<sub>3</sub>, o dai suoi prodotti finali [210]. Inoltre, l'NO regola l'espressione di HO-1, potenziando così l'azione protettiva cardiovascolare di HO-1 [211]. Un aumento dell'NO dopo il trattamento con O<sub>3</sub> è stato segnalato molto recentemente anche da Yasemin Dere Günal e colleghi in un modello di lesione da ischemia / riperfusione (I / R) in ratti Wistar maschi [212]. Tuttavia, in questi modelli di lesioni I / R con ratti, i protocolli sono cruciali per prevedere un risultato positivo dall'utilizzo di O<sub>3</sub> come agente preventivo contro il danno I / R. Nell'esperienza turca, Dere Günal e colleghi hanno riferito di esacerbazioni di ratti Wistar maschi nel loro modello I / R, con riduzione della SOD, causata dal preconditionamento O<sub>3</sub>, ma gli autori non hanno dettagliato il loro modello I / R e hanno usato 0,7 mg / kg di O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> (95% / 5%, ovvero 0,35 µg / ml O<sub>3</sub>) per 20 minuti, mentre Ozkan Onal et al., del Dipartimento di Anestesiologia e Rianimazione, Facoltà di Medicina dell'Università di Selçuk, Konya, Turchia, hanno usato ratti maschi Wistar, un pre-condizionamento O<sub>3</sub> rappresentato da 3,2-4,2 ml per ogni animale di una miscela gassosa O<sub>2</sub> / O<sub>3</sub> (97% / 3%) avente 60 µg / ml O<sub>3</sub>, molto più vicino agli intervalli di



dosaggio (45-50  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) utilizzato nell'uomo per COVID-19 (vedere anche Tabella 1) [206]. Il protocollo  $\text{O}_3$  corretto è obbligatorio per ottenere risultati positivi nell'uso di questo gas. L' $\text{O}_2\text{-O}_3\text{-AHT}$  può portare alla formazione di NO e ossidanti provocando la produzione di 3-nitrotirosina come segnale fondamentale per attivare un lieve stress ossidativo e inibire eventi trombotici, poiché l'NO è di per sé un segnale antitrombotico [213,214]. L'NO ha un ruolo nella trombolisi indotta dall'aspirina [215] e inoltre l'NO regola il fattore tissutale (TF) per la coagulazione, che viene attivato durante l'esacerbazione di COVID-19 che porta alla coagulazione intravascolare disseminata (DIC) e ad altri disturbi vascolari (DIC) [216,217]. Non sappiamo se la rapida diminuzione del D-dimero plasmatico osservata nei pazienti con COVID-19 trattati con  $\text{O}_2\text{-O}_3\text{-AHT}$  [1-3], dovrebbe essere un effetto della segnalazione di NO causata da  $\text{O}_3$  sull'endotelio, ma  $\text{O}_3$  sugli HUVEC consente la produzione di NO [218,219].

Inoltre, nei modelli di lesione da ischemia / riperfusione (I / R),  $\text{O}_3$  ha dimostrato di ridurre e prevenire il danno causato da IR, solitamente attivando la risposta allo stress ossidativo. La disfunzione endoteliale gioca un ruolo importante nel danno I / R [219]. I ratti Wistar, sottoposti a occlusione dell'arteria mesenterica superiore per 1 ora e riperfusione per due ore, quando somministrati con 1,0 mg / kg di  $\text{O}_3$  aumentavano i livelli nel tessuto intestinale di SOD, glutazione perossidasi e catalasi [206]. Inoltre, la protezione dei tessuti da lesioni I / R da  $\text{O}_3$  può comportare l'attivazione di iNOS. Foglieni et al., hanno recuperato l'attività funzionale renale nei ratti sottoposti a nefrectomia unilaterale utilizzando 1 ml di sangue autologo con 5 ml di una miscela  $\text{O}_2 / \text{O}_3$  (50  $\mu\text{g} / \text{ml} \text{O}_3$ ) e hanno osservato che la produzione di iNOS da parte della  $\beta\text{-NADPH}$  diaforasi in i capillari glomerulari sono aumentati in modo significativo, a seguito di lesione ischemica [220]. Sebbene molti dati sull'ozono nelle lesioni I / R si riferiscano all' $\text{O}_3$  gassoso nell'aria come inquinante, l' $\text{O}_3$  inalato riduce l'inibitore-1 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1), aumentando quindi la presenza di plasminogeno tissutale (tPA), consentendo quindi la riduzione di coaguli e trombi e promuovere la fibrinolisi [221], cioè l'interruzione dei trombi intravascolari, in particolare nel microcircolo [222]. È interessante notare che PAI-1 aumenta anche quando SOD e glutazione perossidasi (GSH-Px) sono potenziati, come accade dopo il trattamento con  $\text{O}_3$  [223].

Si è tentati di ipotizzare che le RES prodotte dall' $\text{O}_3$ , come il 4-HNE, possano svolgere un ruolo cruciale nel complesso equilibrio dei segnali pro-trombotici / antitrombotici dopo l'esposizione all' $\text{O}_3$ , poiché il suo dosaggio ha una particolare severità in questo contesto [224]. La proprietà antiossidante dell' $\text{O}_3$  è quindi fondamentale per prevenire la formazione di ROS nella trombosi venosa [225]. Ratti Sprague-Dawley maschi diabetici indotti da streptozotocina, che ricevevano 10 trattamenti con  $\text{O}_2 / \text{O}_3$  50  $\mu\text{g} / \text{ml} \text{O}_3$ , hanno aumentato i livelli di GSH, GSH-Px, SOD e catalasi, oltre a ridurre i perossidi totali e il danno endoteliale [226]. Di Filippo e colleghi hanno trattato ratti

Sprague Dawley, sottoposti a una lesione da ischemia / riperfusione miocardica acuta con 100, 150 e 300  $\mu\text{g} / \text{Kg}$  di una miscela  $\text{O}_2 / \text{O}_3$  iniettata per via intraperitoneale [227]. Il cuore di ratto è stato sottoposto ad esterizzazione, quindi è stata utilizzata una sottile legatura di seta per occludere l'arteria coronaria anteriore sinistra (un dispositivo chiamato LADCA), in prossimità della sua origine. In questa condizione, i ratti sono stati mantenuti sotto ventilazione meccanica con aria ambiente (velocità 54 colpi / min, volume della corsa compreso tra 1,0 e 1,5 ml / 0,1 kg) e una pressione respiratoria positiva stimata tra 0,5 e 1,0  $\text{H}_2\text{O}$  cm. I ratti sono stati sottoposti a 25 minuti di ischemia e 2 ore di riperfusione [227]. La lesione I / R con LADCA ha mostrato una differenza significativa ( $p < 0,001$ ) nel livello di nitrotirosina e IL-6, CXCL8 nei ratti infartuati se trattati con 300  $\mu\text{g} / \text{kg}$  della miscela  $\text{O}_2 / \text{O}_3$  rispetto ai controlli e anche l'espressione delle cellule immunitarie che esprimono CD68, CD8 e CD4 erano completamente differenti negli animali trattati con  $\text{O}_3$  [227]. Inoltre, l'espressione della caspasi 3 nel tessuto miocardico è diminuita a 150  $\mu\text{g} / \text{ml}$   $\text{O}_3$  e molto di più a 300  $\mu\text{g} / \text{ml}$   $\text{O}_3$  [227]. Inoltre, utilizzando gli stessi modelli di lesioni I / R sui ratti, questo gruppo di ricerca ha osservato che negli animali trattati con la miscela  $\text{O}_2 / \text{O}_3$ , un aumento dell'espressione di CD34 + e CD117 / c-kit nel tessuto miocardico e di eNOS, rapidamente si è verificato, mentre il pretrattamento con un noto inibitore di eNOS (30 mg / kg N5- (1-iminoetil) -L-ornitina dicloridrato (L-NIO) iniezione sottocutanea), ha soppresso il ruolo protettivo di  $\text{O}_3$  nell'indurre eNOS [228] . I numerosi modelli di lesioni I / R suggeriscono complessivamente il ruolo fondamentale dell' $\text{O}_3$  come piccola molecola in grado di colpire i geni fondamentali coinvolti nella lesione I / R, come LCN2, CCL2, HP, HMOX1, CCL7, CCL4 e S100A8 e diversi micro-RNA, poiché l' $\text{O}_3$  smorza il meccanismo pro-infiammatorio nel modello di lesione I / R inibendo l'infiammazione mediata da NLRP3 e migliorando la via Nrf2 / Keap1 / ARE [229, 230].

L'attività dell' $\text{O}_3$  nel ridurre l'infiammazione può essere indipendente dalla metodologia utilizzata nell'iniezione di  $\text{O}_3$  medicale, poiché recentemente Fernandez-Cuadros e colleghi hanno osservato una riduzione della PCR, IL-6 e D-dimero in pazienti COVID-19 trattati con ozono terapia rettale [231].

In conclusione, il modo in cui  $\text{O}_3$  può contrastare la trombosi associata a COVID-19 e la coagulazione intravascolare disseminata (DIC) spiega a) la riduzione dell'impatto dei ROS sui segnali pro-trombotici; b) attivazione della via NO / iNOS / eNOS, tramite HO-1, e solitamente da mediatori formati da  $\text{O}_3$  negli intervalli ormetici. Tuttavia, sono necessarie prove più approfondite per valutare il ruolo antitrombotico di  $\text{O}_3$  in COVID-19. La delucidazione dei meccanismi d'azione dell' $\text{O}_3$  nel complesso cross-talk endoteliale-plasma può fornire importanti indizi sulla sua azione farmacologica.

## 5. Conclusioni

Qual è il potenziale dell'O<sub>3</sub> nel trattamento del COVID-19? L'ozono non è un farmaco ma una piccola molecola regolatrice in grado di generare mediatori bioattivi che agiscono sul complesso cross talk stress ossidativo-infiammazione-funzione vascolare. L'attività farmacologica dell'O<sub>3</sub> medicale dipende fondamentalmente dalla capacità dei prodotti derivati dall'O<sub>3</sub> di innescare una lieve segnalazione ROS, o un lieve stress mitocondriale (mitocondri) al fine di attivare una risposta antiossidante, guidando la modulazione dell'immunità verso anti -meccanismi infiammatori e che portano ad un'ampia inibizione degli eventi pro-trombotici. Nonostante tutti i sottoprodotti indotti dall'O<sub>3</sub> siano molecole pro-ossidanti, in grado di indurre danno ossidativo, la loro moderata espressione porta ad una risposta di sopravvivenza, in particolare nei soggetti malati o ammalati, rendendo l'O<sub>3</sub> un potente strumento contro COVID-19. I numerosi rapporti clinici, che mostrano la capacità di O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> AHT di ridurre notevolmente l'esacerbazione della polmonite COVID-19 o ARDS, sono notizie promettenti per affrontare con successo la pandemia di SARS-CoV2.

Acronimi. Bach1: Dominio BTB e omologa CNC 1; Bach2: dominio BTB e omologa CNC 2; COVID-19: malattia da coronavirus 2019; Cys: cisteina; EC50: concentrazione che dà una risposta semi-massima (concentrazione dell'effetto 50%); eNOS: ossido nitrico endoteliale sintasi; ERK: chinasi regolata dal segnale extracellulare; FAS / TNFR: recettori di morte programmata cellulare; GSH-Px: glutatione perossidasi; iNOS: ossido nitrico sintasi inducibile; HMOX1: eme ossigenasi 1; HP: aptoglobina; HUVEC: cellule endoteliali del cordone ombelicale umano; IRAK-1: chinasi 1 associata al recettore dell'interleuchina-1 ; LCN2: lipocalina 2; LGP2: Laboratorio di Genetica e Fisiologia 2; LPS: lipopolisaccaride; MDA: malonildialdeide; MDA5: proteina 5 associata alla differenziazione del melanoma; NADPH: nicotinammide dinucleotide fosfato; Neh2: Omologia 2 simile a Nrf2-ECH; NF-E2: Famiglia Nrf2-ECH; Nrf2: fattore 2 correlato al fattore nucleare eritroide 2; NF-κB: potenziatore della catena leggera kappa del fattore nucleare dei linfociti B attivati; NO: ossido nitrico; NO2: biossido di azoto; PaO<sub>2</sub> / FiO<sub>2</sub>: pressione arteriosa dell'ossigeno sulla frazione inspirata di ossigeno; p38MAPK: proteina chinasi attivata da mitogeno p38; RIG-1: gene 1 inducibile dall'acido retinoico; RTA-408: omaveloxolone; S100A8: proteina legante il calcio S100 A8; SAE: enzima attivante SUMO; SARS-CoV2: sindrome respiratoria grave e acuta-coronavirus 2019; SUMO: piccolo modificatore simile all'ubiquitina; SOD: superossido dismutasi; THP-1: una linea cellulare monocitica di leucemia umana; TNF-α: fattore di necrosi tumorale alfa; TRAP-1: proteina associata al recettore TNF 1); VAV-1: fattore di scambio nucleotidico della guanina vav 1

## Legenda delle figure

Figura 1. Disegno che mostra i principali percorsi presi di mira da O<sub>3</sub> e dai suoi mediatori ROS e RES su COVID-19. 1) L'O<sub>3</sub> può persino entrare nella cellula tramite i recettori degli idrocarburi arilici (AHR) e può formare ROS o RES, entrambi in grado di attivare il sistema Nrf2 / Keap1 / ARE, inducendo una risposta antiossidante. Poiché l'attivazione di Nrf2 blocca la segnalazione NF-κB, l'attivazione di Nrf2 inibisce il segnale infiammatorio (azione antinfiammatoria). 2) La risposta antiossidante è migliorata bloccando la degradazione mediata da Keap-1 di Nrf2; 3) L'attivazione di Nrf2 rilascia HO-1, che esercita un'azione antitrombotica e inoltre inibisce l'espressione e la traslocazione di p65 nel nucleo, sopprimendo così la via NF-κB (azione antinfiammatoria); 4) l'azione antitrombotica mediata da HO-1 promuove la riduzione del danno d'organo nei modelli di lesione I / R, che sono protetti dall'HIF-1α stabilizzato HO-1. L'ossido nitrico (NO), indotto dall'azione antitrombotica, aumenta la produzione di HO-1, enfatizzando così l'effetto benefico di HO-1 sull'endotelio vascolare, azzerando i meccanismi pro-trombotici e promuovendo la protezione cardiovascolare. 5) L'ipossia induce l'attivazione della via HIF-1α, che up-regolando l'espressione dei recettori ACE-1 e successivamente down-regolando ACE2R, inibisce la diffusione della SARS-CoV2 nell'organismo. HIF-1α aumenta la produzione di HO-1. Cerchi verdi (+) = attivazione, cerchi rossi (-) = inibizione. L'ozono è indicato dall'immagine con 3 cerchi pieni

## References

- [1]. S.N. Manjunath, M. Sakar, M. Katapadi, R. Geetha Balakrishna. Recent case studies on the use of ozone to combat coronavirus: Problems and perspectives. *Environ Technol Innov.* Feb;21 (2021) 101313. doi: 10.1016/j.eti.2020.101313
- [2]. M. Izadi, L. Cegolon, M. Javanbakht, A. Sarafzadeh, H. Abolghasemi, G. Alishiri, S. Zhao, B. Einollahi, M. Kashaki, N. Jonaidi-Jafari, M. Asadi, R. Jafari, S. Fathi, H. Nikouejad, M. Ebrahimi, S. Imanizadeh, A.H. Ghazale. Ozone therapy for the treatment of COVID-19 pneumonia: A scoping review. *Int Immunopharmacol.* 92 (2021) :107307.
- [3]. M. Franzini, L. Valdenassi, G. Ricevuti, S. Chirumbolo, M. Depfenhart, D. Bertossi, U. Tirelli. Oxygen-ozone (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>) immunocellular therapy for patients with COVID-19. Preliminary evidence reported. *Int Immunopharmacol.* 88 (2020) 106879
- [4]. M. Shah, J. Captain, V. Vaidya, A. Kulkarni, K. Valsangkar, P.M.K. Nair, G. Ganu. Safety and efficacy of ozone therapy in mild to moderate COVID-19 patients: A phase 1/11 randomized control trial (SEOT study). *Int Immunopharmacol.* 91 (2021) 107301
- [5]. A. Hernández, M. Viñals, A. Pablos, F. Vilás, P.J. Papadacos, D.N. Wijesundera, S.D. Bergese, M. Vives. Ozone therapy for patients with COVID-19 pneumonia: Preliminary report of a prospective case-control study. *Int Immunopharmacol.* 90 (2021) 107261
- [6]. A. Hernández, P.J. Papadacos, A. Torres, D.A. González, M. Vives, C. Ferrando, J. Baeza. Two known therapies could be useful as adjuvant therapy in critical patients infected by COVID-19. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 67(5) (2020) 245-252.

- [7]. Z. Zheng, M. Dong, K. Hu. A preliminary evaluation on the efficacy of ozone therapy in the treatment of COVID-19. *J Med Virol.* 92(11) (2020) 2348-2350
- [8]. C. Tascini, G. Sermann, A. Pagotto, E. Sozio, C. De Carlo, A. Giacinta, F. Sbrana, A. Ripoli, N. Castaldo, M. Merelli, B. Cadeo, C. Macor, A. De Monte. Blood ozonization in patients with mild to moderate COVID-19 pneumonia: a single centre experience. *Intern Emerg Med.* Nov 1 (2020) 1–7.
- [9]. F. Araimo, C. Imperiale, P. Tordiglione, G. Ceccarelli, C. Borrazzo, F. Alessandri, L. Santinelli, G.P. Innocenti, C. Pinacchio, V. Mauro, G.E. Recchia, S. Zanca, A. Caldò, R. Poscia, F. Ruberto, G. d'Ettorre, F. Bilotta, C. Mastroianni, F. Pugliese. Ozone as adjuvant support in the treatment of COVID-19: A preliminary report of probiozovid trial. *J Med Virol.* 93(4) (2021) 2210-2220
- [10]. M.E. Fernández-Cuadros, M.J. Albaladejo-Florín, S. Álava-Rabasa, J. Gallego-Galiana, G.F. Pérez-Cruz, I. Usandizaga-Elio, E. Pacios, D.E. Torres-García, D. Peña-Lora, L. Casique-Bocanegra, M.J. López-Muñoz, J. Rodríguez-de-Cía, O.S. Pérez-Moro. Compassionate Use of Rectal Ozone (O<sub>3</sub>) in Severe COVID-19 Pneumonia: a Case-Control Study. *SN Compr Clin Med.* Mar 22 (2021) 1-15. doi: 10.1007/s42399-021-00849-9.
- [11]. H.A. Hendawy, W. Mosallam, M.E. Abuelnaga, A.M. Sabry. Old Treatment for a New Disease: Can Rectal Ozone Insufflation Be Used for COVID-19 Management? A Case Report. *SN Compr Clin Med.* 14 (2021) 1-4.
- [12]. M. Şahin, F. Eryilmaz, H.H. Keser Şahin. Ozone therapy may be an option for COVID-19 patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 25(6) (2021) 2470-2472.
- [13]. L. Valdenassi, M. Franzini, G. Ricevuti, L. Rinaldi, A.C. Galoforo, U. Tirelli. Potential mechanisms by which the oxygen-ozone (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>) therapy could contribute to the treatment against the coronavirus COVID-19. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 24(8) (2020) 4059-4061
- [14]. R. Viebahn. The biochemical process underlying ozone therapy. *OzoNachrichten* 4:4 (1985) 18-30
- [15]. S. Rilling. The basic clinical applications of ozone therapy. *OzoNachrichten* 4 (1985) 7-17
- [16]. G. Martínez-Sánchez, A. Schwartz, V.D. Donna. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel).* 9(5) (2020) 389
- [17]. P. Richelmi, L. Valdenassi, F. Bertè. Pharmacological principles underlying oxygen-ozone therapy *Neuroradiol J (Rivista di Neuroradiologia)* 14(S1) (2001) 17-22
- [18]. R. Viebahn-Hänsler, O. Sonia León Fernández, Z Fahmy Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept—Guidelines and Treatment Strategies, *Ozone: Science & Engineering*, 34:6 (2012) 408-424.
- [19]. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. *Br J Biomed Sci.* 56(4) (1999) 270-279
- [20]. S. Albert, A.A. Amarilla, B. Trollope, J.D.J. Sng, Y.X. Setoh, N. Deering, N. Modhiran, S.H. Weng, M.C. Melo, N. Hutley, A. Nandy, M.J. Furlong, P.R. Young, D. Watterson, A.R. Grinham, A.A. Khromykh. Assessing the potential of unmanned aerial vehicle spraying of aqueous ozone as an outdoor disinfectant for SARS-CoV-2. *Environ Res.* 196 (2021) 110944.
- [21]. F. Percivalle, M. Clerici, I. Cassaniti, E. Vecchio Nepita, P. Marchese, D. Olivati, C. Catelli, A. Berri, F. Baldanti, P. Marone, R. Bruno, A. Triarico, P. Lago. SARS-CoV-2 viability on different surfaces after gaseous ozone treatment: a preliminary evaluation. *J Hosp Infect.* 110 (2021) 33-36.

- [22]. H. Yano, R. Nakano, Y. Suzuki, A. Nakano, K. Kasahara, H. Hosoi. Inactivation of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by gaseous ozone treatment. *J Hosp Infect.* 106(4) (2020) 837-838.
- [23]. E. Criscuolo, R.A. Diotti, R. Ferrarese, C. Alippi, G. Viscardi, C. Signorelli, N. Mancini, M. Clementi, N. Clementi. Fast inactivation of SARS-CoV-2 by UV-C and ozone exposure on different materials. *Emerg Microbes Infect.* 10(1) (2021) 206-210
- [24]. C Tizaoui Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2), *Ozone: Science & Engineering*, 42:5 (2020) 378-385,
- [25]. S. Zu, Y.Q. Deng, C. Zhou, J. Li, L. Li, Q. Chen, X.F. Li, H. Zhao, S. Gold, J. He, X. Li, C. Zhang, H. Yang, G. Cheng, C.F. Qin. 25-Hydroxycholesterol is a potent SARS-CoV-2 inhibitor. *Cell Res.* 30(11) (2020) 1043-1045.
- [26]. M. Brzeska, K. Szymczyk, A. Szterk. Current Knowledge about Oxysterols: A Review. *J Food Sci.* 81(10) (2016) R2299-R2308.
- [27]. G. Lizard Generation of oxysterols formed by free radicals and enzymes by electrochemical oxidation *Eur J Lipid Sci Technol* 118 (2016) 135-136
- [28]. A.M. Elvis, J.S. Ekta. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2(1) (2011) 66-70
- [29]. M.A. Dayani, A.H. Dehkordi, M.Miraghajani Ozone therapy in chronic diseases. A narrative review of the literature *J Renal Injury Prev* 8(3) (2019) 195-198
- [30]. Braidy N, Izadi M, Sureda A, Jonaidi-Jafari N, Banki A, Nabavi SF, Nabavi SM. Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: Focus on diabetes and spinal pain. *J Cell Physiol.* 233(4) (2018) 2705-2714
- [31]. S. Tahmasebi, M.T. Qasim, M.V. Krivenkova, A.O. Zekiy, L. Thangavelu, S. Aravindhan, M. Izadi, F. Jadidi-Niaragh, M. Ghaebi, S. Aslani, L. Aghebat-Maleki, M. Ahmadi, L. Roshangar. The effects of Oxygen-Ozone therapy on regulatory T-cell responses in multiple sclerosis patients. *Cell Biol Int.* 2021 Mar 16. doi: 10.1002/cbin.11589.
- [32]. J. Ameli, A. Banki, F. Khorvash, V. Simonetti, N.J. Jafari, M. Izadi. Mechanisms of pathophysiology of blood vessels in patients with multiple sclerosis treated with ozone therapy: a systematic review. *Acta Biomed.* 90(3) (2019) 213-217.
- [33]. F. Molinari, D. Rimini, W. Liboni, U.R. Acharya, M. Franzini, S. Pandolfi, G. Ricevuti, F. Vaiano, L. Valdenassi, V. Simonetti. Cerebrovascular pattern improved by ozone autohemotherapy: an entropy-based study on multiple sclerosis patients. *Med Biol Eng Comput.* 2017 Aug;55(8) (2017) 1163-1175
- [34]. F. Molinari, V. Simonetti, M. Franzini, S. Pandolfi, F. Vaiano, L. Valdenassi, W. Liboni. Ozone autohemotherapy induces long-term cerebral metabolic changes in multiple sclerosis patients. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 27(3) (2014) 379-89
- [35]. A.J. Kettle, B.M. Clark, C.C. Winterbourn. Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid: implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone. *J Biol Chem.* 279(18) (2004) 18521-5.
- [36]. B.M. Babior, C. Takeuchi, J. Ruedi, A. Gutierrez, P. Wentworth Jr. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(6) (2003) 3031-4

- [37]. S. Tomono, N. Miyoshi, H. Shiokawa, T. Iwabuchi, Y. Aratani, T. Higashi, H. Nukaya, H. Ohshima. Formation of cholesterol ozonolysis products in vitro and in vivo through a myeloperoxidase-dependent pathway. *J Lipid Res.* 52(1) (2011) 87-97
- [38]. A.J. Kettle, C.C. Winterbourn. Do neutrophils produce ozone? An appraisal of current evidence. *Biofactors.* 24(1-4) (2005) 41-5
- [39]. L.L. Smith. Oxygen, oxysterols, ouabain, and ozone: a cautionary tale. *Free Radic Biol Med.* 37(3) (2004) 318-24
- [40]. A.N. Onyango. Endogenous Generation of Singlet Oxygen and Ozone in Human and Animal Tissues: Mechanisms, Biological Significance, and Influence of Dietary Components. *Oxid Med Cell Longev.* 2016 (2016) 2398573.
- [41]. B.V. Chernyak, E.N. Popova, A.S. Prikhodko, O.A. Grebenchikov, L.A. Zinovkina, R.A. Zinovkin. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc).* 2020 Dec;85(12) (2020) 1543-1553.
- [42]. A.C. Pearce, Y.A. Senis, D.D. Billadeau, M. Turner, S.P. Watson, E. Vigorito. Vav1 and vav3 have critical but redundant roles in mediating platelet activation by collagen. *J Biol Chem.* 279(52) (2004) 53955-62.
- [43]. I.H. Ibrahim, D.E. Ellakwa. SUMO pathway, blood coagulation and oxidative stress in SARS-CoV-2 infection. *Biochem Biophys Rep.* 26 (2021) 100938
- [44]. S. Amor, L. Fernández Blanco, D. Baker. Innate immunity during SARS-CoV-2: evasion strategies and activation trigger hypoxia and vascular damage. *Clin Exp Immunol.* 202(2) (2020) 193-209.
- [45]. S. Rivas-Arancibia, L.F. Zimbrón, E. Rodríguez-Martínez, P.D. Maldonado, G. Borgonio Pérez, M. Sepúlveda-Parada. Oxidative stress-dependent changes in immune responses and cell death in the substantia nigra after ozone exposure in rat. *Front Aging Neurosci.* 7 (2015) 65
- [46]. G.J. Jakab, E.W. Spannhake, B.J. Canning, S.R. Kleeberger, M.I. Gilmour. The effects of ozone on immune function. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 2(Suppl 2) (1995) 77-89.
- [47]. M.D. Cohen, M. Sisco, Y. Li, J.T. Zelikoff, R.B. Schlesinger. Ozone-induced modulation of cell-mediated immune responses in the lungs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 171(2) (2001) 71-84
- [48]. G. Torre-Amione, S.D. Anker, R.C. Bourge, W.S. Colucci, B.H. Greenberg, P. Hildebrandt, A. Keren, M. Motro, L.A. Moyé, J.E. Otterstad, C.M. Pratt, P. Ponikowski, J.L. Rouleau, F. Sestier, B.R. Winkelmann, J.B. Young; Advanced Chronic Heart Failure CLinical Assessment of Immune Modulation Therapy Investigators. Results of a non-specific immunomodulation therapy in chronic heart failure (ACCLAIM trial): a placebo-controlled randomised trial. *Lancet.* 371(9608) (2008) 228-36
- [49]. M. Wang, C.P. Aaron, J. Madrigano, E.A. Hoffman, E. Angelini, J. Yang, A. Laine, T.M. Vetterli, P.L. Kinney, P.D. Sampson, L.E. Sheppard, A.A. Szpiro, S.D. Adar, K. Kirwa, B. Smith, D.J. Lederer, A.V. Diez-Roux, S. Vedal, J.D. Kaufman, R.G. Barr. Association Between Long-term Exposure to Ambient Air Pollution and Change in Quantitatively Assessed Emphysema and Lung Function. *JAMA.* 322(6) (2019) 546-556.
- [50]. S. Chirumbolo, G. Bjørklund. The bimodal SARS-CoV-2 outbreak in Italy as an effect of environmental and allergic causes. *J Allergy Clin Immunol.* 146(2) (2020) 331-332
- [51]. R. Di Mauro, G. Cantarella, R. Bernardini, M. Di Rosa, I. Barbagallo, A. Distefano, L. Longhitano, N. Vicario, D. Nicolosi, G. Lazzarino, D. Tibullo, M.E. Gulino, M.

- Spampinato, R. Avola, G. Li Volti. The Biochemical and Pharmacological Properties of Ozone: The Smell of Protection in Acute and Chronic Diseases. *Int J Mol Sci.* 20(3) (2019) :634.
- [52]. D. Gemmati, B. Bramanti, M.L. Serino, P. Secchiero, G. Zauli, V. Tisato. COVID-19 and Individual Genetic Susceptibility/Receptivity: Role of ACE1/ACE2 Genes, Immunity, Inflammation and Coagulation. Might the Double X-chromosome in Females Be Protective against SARS-CoV-2 Compared to the Single X-Chromosome in Males? *Int J Mol Sci.* 21(10) (2020) 3474.
- [53]. J.M. Hemming, B.R. Hughes, A.R. Rennie, S. Tomas, R.A. Campbell, A.V. Hughes, T. Arnold, S.W. Botchway, K.C. Thompson. Environmental Pollutant Ozone Causes Damage to Lung Surfactant Protein B (SP-B). *Biochemistry.* 54(33) (2015) 5185-97
- [54]. F.J. Walther, L.M. Gordon, J.A. Zasadzinski, M.A. Sherman, A.J. Waring. Surfactant protein B and C analogues. *Mol Genet Metab.* 71(1-2) (2000) 342-51.
- [55]. V. Bocci, E. Borrelli, V. Travagli, I. Zanardi. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 29(4) (2009) 646-82.
- [56]. V. Bocci, I. Zanardi, D. Michaeli, V. Travagli. Mechanisms of action and chemical-biological interactions between ozone and body compartments: a critical appraisal of the different administration routes. *Curr Drug Ther.* 4 (2009) 159–173.
- [57]. V. Bocci, I. Zanardi, V. Travagli. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Med Gas Res.* 1(1) (2011) 6
- [58]. V. Travagli, I. Zanardi, P. Bernini, S. Nepi, L. Tenori, V. Bocci. Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. *Int J Toxicol.* 29(2) (2010) 165-74
- [59]. R.F. Hamilton Jr, M.E. Hazbun, C.A. Jumper, W.L. Eschenbacher, A. Holian. 4-Hydroxynonenal mimics ozone-induced modulation of macrophage function ex vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15(2) (1996) 275-82.
- [60]. R. Bhandari, G. Khanna, D. Kaushik, A. Kuhad. Divulging the Intricacies of Crosstalk Between NF-Kb and Nrf2-Keap1 Pathway in Neurological Complications of COVID-19. *Mol Neurobiol.* Mar 8 (2021) 1–15.
- [61]. I. Zanardi, E. Borrelli, G. Valacchi, V. Travagli, V. Bocci. Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. *Curr Med Chem.* 23(4) (2016) 304-14
- [62]. A. Cuadrado, M. Pajares, C. Benito, J. Jiménez-Villegas, M. Escoll, R. Fernández-Ginés, A.J. Garcia Yagüe, D. Lastra, G. Manda, A.I. Rojo, A.T. Dinkova-Kostova. Can Activation of NRF2 Be a Strategy against COVID-19? *Trends Pharmacol Sci.* 41(9) (2020) 598-610. doi: 10.1016/j.tips.2020.07.003.
- [63]. Q. Ma. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 53 (2013) 401-26.
- [64]. J.H. Zhang, X. Yang, Y.P. Chen, J.F. Zhang, C.Q. Li. Nrf2 Activator RTA-408 Protects Against Ozone-Induced Acute Asthma Exacerbation by Suppressing ROS and  $\gamma\delta$ T17 Cells. *Inflammation.* 42(5) (2019) 1843-1856. doi: 10.1007/s10753-019-01046-6.
- [65]. S.M. Hassan, M.J. Jawad, S.W. Ahjel, R.B. Singh, J. Singh, S.M. Awad, N.R. Hadi. The Nrf2 Activator (DMF) and Covid-19: Is there a Possible Role? *Med Arch.* 2020 Apr;74(2) (2020) 134-138.



- [66]. K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J.D. Engel, M. Yamamoto. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13(1) (1999) 76-86.
- [67]. V.O. Tkachev, E.B. Menshchikova, N.K. Zenkov. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc).* 76(4) (2011) 407-22
- [68]. V.V. Lyakhovich, V.A. Vavilin, N.K. Zenkov, E.B. Menshchikova. Active defense under oxidative stress. The antioxidant responsive element. *Biochemistry (Mosc).* 71(9) (2006) 962-74
- [69]. M. Galiè, V. Covi, G. Tabaracci, M. Malatesta. The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *Int J Mol Sci.* 20(16) (2019) 4009
- [70]. V. Rubio, M. Valverde, E. Rojas. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. *Environ Sci Pollut Res Int.* 17(2) (2010) 369-82.
- [71]. B. Clavo, F. Rodríguez-Esparragón, D. Rodríguez-Abreu, G. Martínez-Sánchez, P. Llontop, D. Aguiar-Bujanda, L. Fernández-Pérez, N. Santana-Rodríguez. Modulation of Oxidative Stress by Ozone Therapy in the Prevention and Treatment of Chemotherapy-Induced Toxicity: Review and Prospects. *Antioxidants (Basel).* 8(12) (2019) 588.
- [72]. G. Martínez-Sánchez, A. Schwartz, V.D. Donna. Potential Cytoprotective Activity of Ozone Therapy in SARS-CoV-2/COVID-19. *Antioxidants (Basel).* 2020 May 6;9(5) (2020) 389.
- [73]. J.D. Wardyn, A.H. Ponsford, C.M. Sanderson. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways. *Biochem Soc Trans.* 43(4) (2015) 621-6.
- [74]. M. Yu, H. Li, Q. Liu, F. Liu, L. Tang, C. Li, Y. Yuan, Y. Zhan, W. Xu, W. Li, H. Chen, C. Ge, J. Wang, X. Yang. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell Signal.* 2011 May;23(5) (2011) 883-92
- [75]. K.C. Huth, B. Saugel, F.M. Jakob, C. Cappello, M. Quirling, E. Paschos, K. Ern, R. Hickel, K. Brand. Effect of aqueous ozone on the NF-kappaB system. *J Dent Res.* 86(5) (2007) 451-6.
- [76]. V. Simonetti, V. Quagliariello, M. Franzini, R,V. Iaffaioli, N. Maurea, L. Valdenassi. Ozone Exerts Cytoprotective and Anti-Inflammatory Effects in Cardiomyocytes and Skin Fibroblasts after Incubation with Doxorubicin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019 (2019) 2169103.
- [77]. C. Cappello, B. Saugel, K.C. Huth, A. Zwergal, M. Krautkrämer, C. Furman, M. Rouis, B. Wieser, H.W. Schneider, D. Neumeier, K. Brand. Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF-kappaB and IRAK-1-associated signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(1) (2007) 226-32.
- [78]. V.A. Bocci, I. Zanardi, V. Travagli. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med.* 9 (2011) 66
- [79]. E.J. Calabrese, L.A. Baldwin. A general classification of U-shaped dose-response relationships in toxicology and their mechanistic foundations. *Hum Exp Toxicol.* 17(7) (1998) 353-64
- [80]. D.W. Nebert. Aryl hydrocarbon receptor (AHR): "pioneer member" of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of "sensors" of foreign and endogenous signals. *Prog Lipid Res.* 67 (2017) 38-57.

- [81]. S. Chirumbolo, G. Bjørklund. PERM Hypothesis: The Fundamental Machinery Able to Elucidate the Role of Xenobiotics and Hormesis in Cell Survival and Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 18(1) (2017) 165.
- [82]. C. Michaudel, F. Bataille, I. Maillet, L. Fauconnier, C. Colas, H. Sokol, M. Straube, A. Couturier-Maillard, L. Dumoutier, J. van Snick, V.F. Quesniaux, D. Togbe, B. Ryffel. Ozone-Induced Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Controls Lung Inflammation via Interleukin-22 Modulation. *Front Immunol.* 11 (2020) 144.
- [83]. S. Chirumbolo S. The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 9(4) (2010) 263-85.
- [84]. B. Cisterna, M. Costanzo, A. Nodari, M. Galiè, S. Zanzoni, P. Bernardi, V. Covi, G. Tabaracci, M. Malatesta. Ozone Activates the Nrf2 Pathway and Improves Preservation of Explanted Adipose Tissue In Vitro. *Antioxidants (Basel).* 9(10) (2020) 989. doi: 10.3390/antiox9100989.
- [85]. L. Re, M.N. Mawsouf, S. Menéndez, O.S. León, G.M. Sánchez, F. Hernández. Ozone therapy: clinical and basic evidence of its therapeutic potential. *Arch Med Res.* 39(1) (2008) 17-26.
- [86]. E. Kansanen, S.M. Kuosmanen, H. Leinonen, A.L. Levonen. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol.* 1(1) (2013) 45-9.
- [87]. S. Saha, B. Buttari, E. Panieri, E. Profumo, L. Saso. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules.* 25(22) (2020) 5474.
- [88]. D. Olganier, E. Farahani, J. Thyrssted, J. Blay-Cadanet, A. Herengt, M. Idorn, A. Hait, B. Hernaez, A. Knudsen, M.B. Iversen, M. Schilling, S.E. Jørgensen, M. Thomsen, L.S. Reinert, M. Lappe, H.D. Hoang, V.H. Gilchrist, A.L. Hansen, R. Ottosen, C.G. Nielsen, C. Møller, D. van der Horst, S. Peri, S. Balachandran, J. Huang, M. Jakobsen, E.B. Svenningsen, T.B. Poulsen, L. Bartsch, A.L. Thielke, Y. Luo, T. Alain, J. Rehwinkel, A. Alcamí, J. Hiscott, T.H. Mogensen, S.R. Paludan, C.K. Holm. SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate. *Nat Commun.* 11(1) (2020) 4938
- [89]. E.L. Mills, D.G. Ryan, H.A. Prag, D. Dikovskaya, D. Menon, Z. Zaslona, M.P. Jedrychowski, A.S.H. Costa, M. Higgins, E. Hams, J. Szpyt, M.C. Runtsch, M.S. King, J.F. McGouran, R. Fischer, B.M. Kessler, A.F. McGettrick, M.M. Hughes, R.G. Carroll, L.M. Booty, E.V. Knatko, P.J. Meakin, M.L.J Ashford, L.K. Modis, G. Brunori, D.C. Sévin, P.G. Fallon, S.T. Caldwell, E.R.S Kunji, E.T. Chouchani, C. Frezza, A.T. Dinkova-Kostova, R.C. Hartley, M.P. Murphy, L.A. O'Neill. Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature.* 556(7699) (2018) 113-117.
- [90]. P.P. Ogger, A.J. Byrne. Macrophage metabolic reprogramming during chronic lung disease. *Mucosal Immunol.* 2021 Mar;14(2) (2021) 282-295
- [91]. S. Nair, J.P. Huynh, V. Lampropoulou, E. Loginicheva, E. Esaulova, A.P. Gounder, A.C.M. Boon, E.A. Schwarzkopf, T.R. Bradstreet, B.T. Edelson, M.N. Artyomov, C.L. Stallings, M.S. Diamond. *Irg1* expression in myeloid cells prevents immunopathology during *M. tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 2018 Apr 2;215(4):1035-1045
- [92]. A. Viola, F. Munari, R. Sánchez-Rodríguez, T. Sclaro, A. Castegna. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol.* 10 (2019) 1462.

- [93]. S.S. Im, L. Yousef, C. Blaschitz, J.Z. Liu, R.A. Edwards, S.G. Young, M. Raffatellu, T.F. Osborne. Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. *Cell Metab.* 13(5) (2011) 540-9.
- [94]. S.B. Joseph, M.N. Bradley, A. Castrillo, K.W. Bruhn, P.A. Mak, L. Pei, J. Hogenesch, R.M. O'Connell, G. Cheng, E. Saez, J.F. Miller, P. Tontonoz. LXR-dependent gene expression is important for macrophage survival and the innate immune response. *Cell.* 119(2) (2004) 299-309
- [95]. V.R. Sunil, K. Patel-Vayas, J. Shen, J.D. Laskin, D.L. Laskin. Classical and alternative macrophage activation in the lung following ozone-induced oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 263(2) (2012) 195-202.
- [96]. V.R. Sunil, K. Patel-Vayas, J. Shen, J.D. Laskin, D.L. Laskin. Classical and alternative macrophage activation in the lung following ozone-induced oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 263(2) (2012) 195-202.
- [97]. Speen AM, Kim HH, Bauer RN, Meyer M, Gowdy KM, Fessler MB, Duncan KE, Liu W, Porter NA, Jaspers I. Ozone-derived Oxysterols Affect Liver X Receptor (LXR) Signaling: a potential role fo lipid-protein adducts. *J Biol Chem.* 291(48) (2016) 25192-25206
- [98]. C. Choi, D.K. Finlay. Diverse Immunoregulatory Roles of Oxysterols-The Oxidized Cholesterol Metabolites. *Metabolites.* 10(10) (2020) 384.
- [99]. M.K. Pulfer, R.C. Murphy. Formation of biologically active oxysterols during ozonolysis of cholesterol present in lung surfactant. *J Biol Chem.* 279(25) (2004) 26331-8.
- [100]. L. Plantier, V. Besnard, Y. Xu, M. Ikegami, S.E. Wert, A.N. Hunt, A.D. Postle, J.A. Whitsett. Activation of sterol-response element-binding proteins (SREBP) in alveolar type II cells enhances lipogenesis causing pulmonary lipotoxicity. *J Biol Chem.* 287(13) (2012) 10099-10114
- [101]. W.A. Pryor, D.G. Prier, D.F. Church. Radical production from the interaction of ozone and PUFA as demonstrated by electron spin resonance spin-trapping techniques. *Environ Res.* 24(1) (1981) 42-52.
- [102]. V. Bocci *Ozone – A new medical drug.* 2005, Dordrecht, The Netherlands. Springer 1-295.
- [103]. I. Ueno, M. Hoshino, T. Miura, N. Shinriki N. Ozone exposure generates free radicals in the blood samples in vitro. Detection by the ESR spin-trapping technique. *Free Radic Res.* 29(2) (1998) 127-35
- [104]. V. Bocci *The question of balance: the interaction between blood and ozone in Oxidants in biology: a question of balance* G Valacchi and P.A. Davis, eds, Springer, The Netherlands, 2008, p. 159
- [105]. A.G. Timblin, K.M. Tharp, B. Ford, J.M Winchenster, J. Wang, S. Zhu, .R.I. Khan, S.K. Louie, A.T. Iavarone, J. ten Hoeve, D.K. Nomura, A. Stahl, K. Saijo Mitohormesis reprograms macrophage metabolism to enforce tolerance bioRxiv 2020.10.20.347443; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.10.20.347443>
- [106]. C. Scassellati, A.C. Galoforo, C. Bonvicini, C. Esposito, G. Ricevuti. Ozone: a natural bioactive molecule with antioxidant property as potential new strategy in aging and in neurodegenerative disorders. *Ageing Res Rev.* 63 (2020) 101138
- [107]. C. Schneider, K.A. Tallman, N.A. Porter, A.R. Brash. Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. *J Biol Chem.* 276(24) (2001) 20831-8

- [108]. H. Sonowal, K.V. Ramana. 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal in the Regulation of Anti-Oxidative and Pro-Inflammatory Signaling Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 (2019) 5937326
- [109]. R.F. Hamilton Jr, L. Li, W.L. Eschenbacher, L. Szweda, A. Holian. Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. *Am J Physiol.* 274(1) (1998) L8-16
- [110]. V. Bocci, G. Valacchi. Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem.* 3 (2015) 4.
- [111]. Z.H. Chen, Y. Saito, Y. Yoshida, A. Sekine, N. Noguchi, E. Niki. 4-Hydroxynonenal induces adaptive response and enhances PC12 cell tolerance primarily through induction of thioredoxin reductase 1 via activation of Nrf2. *J Biol Chem.* 280(51) (2005) 41921-7
- [112]. H. Sonowal, K.V. Ramana. 4-Hydroxy-Trans-2-Nonenal in the Regulation of Anti-Oxidative and Pro-Inflammatory Signaling Pathways. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 (2019) 5937326.
- [113]. A. Ishikado, Y. Nishio, K. Morino, S. Ugi, H. Kondo, T. Makino, A. Kashiwagi, H. Maegawa. Low concentration of 4-hydroxy hexenal increases heme oxygenase-1 expression through activation of Nrf2 and antioxidative activity in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 402(1) (2010) 99-104.
- [114]. B. Vurusaner, P. Gamba, S. Gargiulo, G. Testa, E. Staurenghi, G. Leonarduzzi, G. Poli, H. Basaga. Nrf2 antioxidant defense is involved in survival signaling elicited by 27-hydroxycholesterol in human promonocytic cells. *Free Radic Biol Med.* 91 (2016) 93-104.
- [115]. A. Van der Vliet, M. Hristova, S. McCarthy, D. Kasahara. Cellular and environmental electrophiles: balancing redox signaling, inflammation and cell death pathways, in *Oxidants in Biology* G Valacchi, P.A. Davis, Eds. Springer The Netherlands, 2008 pp 37-66
- [116]. R. Saito, T. Suzuki, K. Hiramoto, S. Asami, E. Naganuma, H. Suda, T. Iso, H. Yamamoto, M. Morita, L. Baird, Y. Furusawa, T. Negishi, M. Ichinose, M. Yamamoto. Characterizations of Three Major Cysteine Sensors of Keap1 in Stress Response. *Mol Cell Biol.* 36(2) (2015) 271-84.
- [117]. T. Suzuki, A. Muramatsu, R. Saito, T. Iso, T. Shibata, K. Kuwata, S.J. Kawaguchi, T. Iwawaki, S. Adachi, H. Suda, M. Morita, K. Uchida, L. Baird, M. Yamamoto. Molecular Mechanism of Cellular Oxidative Stress Sensing by Keap1. *Cell Rep.* 28(3) (2019) 746-758.e4
- [118]. V. Travagli, I. Zanardi, P. Bernini, S. Nepi, L. Tenori, V. Bocci. Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. *Int J Toxicol.* 29(2) (2010) 165-74
- [119]. J.D. Chang, H.S. Lu, Y.F. Chang, D. Wang. Ameliorative effect of ozone on cytokine production in mice injected with human rheumatoid arthritis synovial fibroblast cells. *Rheumatol Int.* 26(2) (2005) 142-51.
- [120]. M. Merad, J.C. Martin. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* 20(6) (2020) 355-362. doi: 10.1038/s41577-020-0331-4. Epub 2020 May 6. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2020 Jun 2;
- [121]. S.W. Luckey, M. Taylor, B.P. Sampey, R.I. Scheinman, D.R. Petersen. 4-hydroxynonenal decreases interleukin-6 expression and protein production in primary rat Kupffer cells by inhibiting nuclear factor-kappaB activation. *J Pharmacol Exp Ther.* (2002) 302(1):296-303.

- [122]. C. Marantos, V. Mukaro, J. Ferrante, C. Hii, A. Ferrante. Inhibition of the lipopolysaccharide-induced stimulation of the members of the MAPK family in human monocytes/macrophages by 4-hydroxynonenal, a product of oxidized omega-6 fatty acids. *Am J Pathol.* 173(4) (2008) 1057-66.
- [123]. V. Bocci, C. Aldinucci, F. Mosci, F. Carraro, G. Valacchi. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm.* 2007 (2007) 26785.
- [124]. R. Cecchini, A.L. Cecchini. SARS-CoV-2 infection pathogenesis is related to oxidative stress as a response to aggression. *Med Hypotheses.* 143 (2020) 110102
- [125]. B.V. Chernyak, E.N. Popova, A.S. Prikhodko, O.A. Grebenchikov, L.A. Zinovkina, R.A. Zinovkin. COVID-19 and Oxidative Stress. *Biochemistry (Mosc).* 85(12) (2020) 1543-1553
- [126]. M. Rossi, M. Piagnerelli, A. Van Meerhaeghe, K. Zouaoui Boudjeltia. Heme oxygenase-1 (HO-1) cytoprotective pathway: A potential treatment strategy against coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine storm syndrome. *Med Hypotheses.* 144 (2020) 110242
- [127]. S. Shibahara, F. Han, B. Li, K. Takeda. Hypoxia and heme oxygenases: oxygen sensing and regulation of expression. *Antioxid Redox Signal.* 9(12) (2007) 2209-25
- [128]. A. AbdelMassih, E. Yacoub, R.J. Husseiny, A. Kamel, R. Hozaien, M. El Shershaby, M. Rajab, S. Yacoub, M.A. Eid, M. Elahmady, M. Gadalla, S. Mokhtar, A.A. Hassan, A.S. Abou-Zeid, M. Hussein, N. Aboushadi, N. Emad, N. Zahra, A. Hassan, E. Hussein, N. Ibrahim, N. El Nahhas, T. Elahmady, M. Khallaf, H. Mustafa, N. Anis, M. Albehairy, F. Hanna, L. Moris, J. Ye. Hypoxia-inducible factor (HIF): The link between obesity and COVID-19. *Obes Med.* 30 (2020) 22:100317.
- [129]. G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue, G.L. Semenza. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(12) (1995) 5510-4.
- [130]. J.F., O'Rourke, G.U. Dachs, J.M. Gleadle, P.H. Maxwell, C.W. Pugh, I.J. Stratford, S.M. Wood, P.J. Ratcliffe. Hypoxia response elements. *Oncol Res.* 9(6-7) (1997) 327-32
- [131]. A. Güçlü, H.A. Erken, G. Erken, Y. Dodurga, A. Yay, Ö. Özçoban, H. Şimşek, A. Akçılar, F.E. Koçak. The effects of ozone therapy on caspase pathways, TNF- $\alpha$ , and HIF-1 $\alpha$  in diabetic nephropathy. *Int Urol Nephrol.* 48(3) (2016) 441-50.
- [132]. E. Sağlam, S.B. Alinca, T.Z. Celik, U.P. Hacisalihoglu, M.A. Dogan. Evaluation of the effect of topical and systemic ozone application in periodontitis: an experimental study in rats. *J Appl Oral Sci.* 28 (2019) e20190140
- [133]. A. Banning, R. Brigelius-Flohé. NF-kappaB, Nrf2, and HO-1 interplay in redox-regulated VCAM-1 expression. *Antioxid Redox Signal.* 7(7-8) (2005) 889-99.
- [134]. M. Tong, Y. Jiang, D. Xia, Y. Xiong, Q. Zheng, F. Chen, L. Zou, W. Xiao, Y. Zhu. Elevated Expression of Serum Endothelial Cell Adhesion Molecules in COVID-19 Patients. *J Infect Dis.* 222(6) (2020) 894-898.
- [135]. G. Valacchi, P. Davies. *Oxidants in Biology. A question of balance.* Springer The Netherlands, 2008, pp 324
- [136]. K. Uchida, T. Shibata. 15deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>: an electrophilic trigger of cellular responses *Chem Res Toxicol* 21(1) (2008) 138-144
- [137]. A.L. Groeger, B.A. Freeman. Signaling actions of electrophiles: anti-inflammatory therapeutic candidates. *Mol Interv.* 10(1) (2010) 39-50.

- [138]. L. Peng, L. Mundada, J.M. Stomel, J.J. Liu, J. Sun, S.F. Yet, W.P. Fay. Induction of heme oxygenase-1 expression inhibits platelet-dependent thrombosis. *Antioxid Redox Signal*. 6(4) (2004) 729-35.
- [139]. A. Görlach Redox control of blood coagulation. *Antioxid Redox Signal*. 6(4) (2004) 687-90.
- [140]. L. Peng, F. William. [Heme oxygenase-1 inhibits thrombosis under oxidative stress]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 26(11) (2005) 665-8.
- [141]. N. Lindenblatt, R. Bordel, W. Schareck, M.D. Menger, B. Vollmar. Vascular heme oxygenase-1 induction suppresses microvascular thrombus formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24(3) (2004) 601-6.
- [142]. Y.M. Yang, F. Fang, X. Li, L. Yu, Z.C. Wang. TRAIL overexpression co-regulated by Egr1 and HRE enhances radiosensitivity of hypoxic A549 cells depending on its apoptosis inducing role. *Oncol Rep*. 37(1) (2017) 533-539
- [143]. R.K. Toth, N.A. Warfel. Strange Bedfellows: Nuclear Factor, Erythroid 2-Like 2 (Nrf2) and Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) in Tumor Hypoxia. *Antioxidants (Basel)*. 6(2) (2017) 27
- [144]. B. Afsar, M. Kanbay, R.E. Afsar. Hypoxia inducible factor-1 protects against COVID-19: A hypothesis. *Med Hypotheses*. 143 (2020) 109857
- [145]. L.L. Dunn, S.M.Y. Kong, S. Tumanov, W. Chen, J. Cantley, A. Ayer, G.J. Maghzal, R.G. Midwinter, K.H. Chan, M.K.C. Ng, R. Stocker. Hmox1 (Heme Oxygenase-1) Protects Against Ischemia-Mediated Injury via Stabilization of HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 41(1) (2021) 317-330.
- [146]. B. Dawn, R. Bolli. HO-1 induction by HIF-1: a new mechanism for delayed cardioprotection? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(2) (2005) H522-4.
- [147]. P.J. Liu, P. Balfe, J.A. McKeating, M. Schilling. Oxygen Sensing and Viral Replication: Implications for Tropism and Pathogenesis. *Viruses*. 12(11) (2020) 1213.
- [148]. V. Bocci, C. Aldinucci, F. Mosci, F. Carraro, G. Valacchi. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm*. 2007 (2007) 26785
- [149]. W.L. Su, C.P. Lin, H.C. Hang, P.S. Wu, C.F. Cheng, Y.C. Chao. Desaturation and heme elevation during COVID-19 infection: A potential prognostic factor of heme oxygenase-1. *J Microbiol Immunol Infect*. 54(1) (2021) 113-116.
- [150]. P.L. Hooper. COVID-19 and heme oxygenase: novel insight into the disease and potential therapies. *Cell Stress Chaperones*. 25(5) (2020) 707-710.
- [151]. B.K. Maiti. Heme/Hemeoxygenase-1 System Is a Potential Therapeutic Intervention for COVID-19 Patients with Severe Complications. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 3(5) (2020) 1032-1034
- [152]. A. Loboda, M. Damulewicz, E. Pyza, A. Jozkowicz, J. Dulak. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 73(17) (2016) 3221-47
- [153]. J.L. Schultze, A.C. Aschenbrenner. COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*. Feb 16 (2021) S0092-8674(21)00218-X.
- [154]. A. Hosseini, V. Hashemi, N. Shomali, F. Asghari, T. Gharibi, M. Akbari, S. Gholizadeh, A. Jafari. Innate and adaptive immune responses against coronavirus. *Biomed Pharmacother*. 132 (2020) 110859.

- [155]. A. Hasan, E. Al-Ozairi, Z. Al-Baqsumi, R. Ahmad, F. Al-Mulla. Cellular and Humoral Immune Responses in Covid-19 and Immunotherapeutic Approaches. *Immunotargets Ther.* 10 (2021) 63-85.
- [156]. A.P.S. Tartari, F.F. Moreira, M.C.D.S. Pereira, E. Carraro, F.J. Cidral-Filho, A.I. Salgado, I.I. Kerppers. Anti-inflammatory Effect of Ozone Therapy in an Experimental Model of Rheumatoid Arthritis. *Inflammation.* 43(3) (2020) 985-993
- [157]. B. Yang, R. Li, C. Michael Greenlief, K.L. Fritsche, Z. Gu, J. Cui, J.C. Lee, D.Q. Beversdorf, G.Y. Sun. Unveiling anti-oxidative and anti-inflammatory effects of docosahexaenoic acid and its lipid peroxidation product on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *J Neuroinflammation.* 15(1) (2018) 202.
- [158]. S. Tahmasebi, M.T. Qasim, M.V. Krivenkova, A.O. Zekiy, L. Thangavelu, S. Aravindhan, M. Izadi, F. Jadidi-Niaragh, M. Ghaebi, S. Aslani, L. Aghebat-Maleki, M. Ahmadi, L. Roshangar. The effects of Oxygen-Ozone therapy on regulatory T-cell responses in multiple sclerosis patients. *Cell Biol Int.* 2021 Mar 16. doi: 10.1002/cbin.11589.
- [159]. M. Rahimzadeh, N. Naderi. Towards understanding of regulatory T cells in COVID-19: a systematic review. *J Med Virol.* 2021 Feb 19. doi: 10.1002/jmv.26891
- [160]. M. Margalit, E. Attias, D. Attias, D. Elstein, A. Zimran, Y. Matzner. Effect of ozone on neutrophil function in vitro. *Clin Lab Haematol.* 23(4) (2001) 243-7.
- [161]. D.B. Peden, L. Dailey. Modulation of mast cell functions by in vitro ozone exposure. *Am J Physiol.* 268(6 Pt 1) (1995) L902-10
- [162]. T.C. Theoharides. Potential association of mast cells with coronavirus disease 2019. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 126(3) (2021) 217-218
- [163]. U.C. Kucuksezer, E. Zekiroglu, P. Kasapoglu, S. Adin-Cinar, E. Aktas-Cetin, G. Deniz. A stimulatory role of ozone exposure on human natural killer cells. *Immunol Invest.* 43(1) (2014) 1-12. doi: 10.3109/08820139.2013.810240
- [164]. A. Tosello-Tramont, F.A. Surette, S.E. Ewald, Y.S. Hahn. Immunoregulatory Role of NK Cells in Tissue Inflammation and Regeneration. *Front Immunol.* 8 (2007) 301. doi: 10.3389/fimmu.2017.00301.
- [165]. B. Böskén, M. Hepner-Schefczyk, S. Vonderhagen, M. Dudda, S.B. Flohé. An Inverse Relationship Between c-Kit/CD117 and mTOR Confers NK Cell Dysregulation Late After Severe Injury. *Front Immunol.* 11 (2020) 1200.
- [166]. C.K. Gandhi, A.N. Mikerov, F. Durrani, T.M. Umstead, S. Hu, G. Wang, D.S. Phelps, J. Floros. Impact of Ozone, Sex, and Gonadal Hormones on Bronchoalveolar Lavage Characteristics and Survival in SP-A KO Mice Infected with *Klebsiella pneumoniae*. *Microorganisms.* 8(9) (2020) 1354.
- [167]. I.L. Cabral, S.L. Utzig, F.W. Banhuk, J.V. Staffen, E.A. Loth, J.P.A. de Amorim, F. Negretti, R.F. Gandra, T.S. Ayala, R.a. Menolli. Aqueous ozone therapy improves the standard treatment of leishmaniasis lesions in animals leading to local and systemic alterations. *Parasitol Res.* 119(12) (2020) 4243-4253.
- [168]. M. Francis, G. Guo, B. Kong, E.V. Abramova, J.A. Cervelli, A.J. Gow, J.D. Laskin, D.L. Laskin. Regulation of Lung Macrophage Activation and Oxidative Stress Following Ozone Exposure by Farnesoid X Receptor. *Toxicol Sci.* 177(2) (2020) 441-453. doi: 10.1093/toxsci/kfaa111

- [169]. R.A. Zinovkin, O.A. Grebenchikov OA Transcription Factor Nrf2 as a Potential Therapeutic Target for Prevention of Cytokine Storm in COVID19 Patient *Biochemistry (Moscow)*, 85(7) (2020) 833-837.
- [170]. E.H. Kobayashi, T. Suzuki, R. Funayama, T. Nagashima, M. Hayashi, H. Sekine, N. Tanaka, T. Moriguchi, H. Motohashi, K. Nakayama, M. Yamamoto. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun.* 7 (2016) 11624
- [171]. S. Chirumbolo, S. Pandolfi, L. Valdenassi, D. Bertossi, M. Franzini. The need for a correct oxygen-ozone autohemotherapy (O<sub>3</sub>-AHT) in patients with mild to moderate COVID-19 pneumonia. *Intern Emerg Med.* Jan 5 (2021) 1–2.
- [172]. A. De Monte, G. Sermann, E. Sozio, F. Sbrana, C. Tascini. Blood ozonization in patients with mild to moderate COVID-19 pneumonia: a single centre experience: reply. *Intern Emerg Med.* Feb 3 (2021) 1–2
- [173]. S. Chirumbolo, M. Franzini, V. Simonetti, L. Valdenassi, G. Ricevuti, D. Bertossi, S. Pandolfi. Oxygen-ozone autohemotherapy against COVID-19 needs to fit highly experienced, customized, and standardized protocols to succeed. *J Med Virol.* 2021 Jan 27. doi: 10.1002/jmv.26806.
- [174]. A.F. Ribeiro Dos Santos Miggiolaro, J. da Silva Motta Junior, C. Busatta Vaz de Paula, S. Nagashima, M.A. Scaranello Malaquias, L. Baena Carstens, A.N. Moreno-Amaral, C. Pellegrino Baena, L. de Noronha. Covid-19 cytokine storm in pulmonary tissue: Anatomopathological and immunohistochemical findings. *Respir Med Case Rep.* 31 (2020) 101292.
- [175]. X.M. Zhang, L. Guo, X. Huang, Q.M. Li, M.H. Chi. 4-Hydroxynonenal Regulates TNF- $\alpha$  Gene Transcription Indirectly via ETS1 and microRNA-29b in Human Adipocytes Induced From Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Anat Rec (Hoboken).* 2016 Aug;299(8) (2016) 1145-52.
- [176]. X. Dou, S. Li, Z. Wang, D. Gu, C. Shen, T. Yao, Z. Song. Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by 4-hydroxynonenal contributes to liver injury in a mouse model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol.* 181(5) (2012) 1702-10
- [177]. C. Marantos, V. Mukaro, J. Ferrante, C. Hii, A. Ferrante. Inhibition of the lipopolysaccharide-induced stimulation of the members of the MAPK family in human monocytes/macrophages by 4-hydroxynonenal, a product of oxidized omega-6 fatty acids. *Am J Pathol.* 173(4) (2008) 1057-66.
- [178]. J. Nieva, P. Wentworth Jr. The antibody-catalyzed water oxidation pathway--a new chemical arm to immune defense? *Trends Biochem Sci.* 29(5) (2004) 274-8
- [179]. 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. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science.* 2002 Dec 13;298(5601):2195-9.
- [180]. E.S. Musiek, L. Gao, G.L. Milne, W. Han, M.B. Everhart, D. Wang, M.G. Backlund, R.N. DuBois, G. Zanoni, G. Vidari, T.S. Blackwell, J.D. Morrow. Cyclopentenone isoprostanes inhibit the inflammatory response in macrophages. *J Biol Chem.* 280(42) (2005) 35562-70



- [181]. A. Reboldi, E.V. Dang, J.G. McDonald, G. Liang, D.W. Russell, J.G. Cyster. Inflammation. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. *Science*. 345(6197) (2014) 679-84
- [182]. M. Sagai, V. Bocci. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res*. 1 (2011) 29
- [183]. D.L. Laskin, V. Sunil, Y. Guo, D.E. Heck, J.D. Laskin . Increased nitric oxide synthase in the lung after ozone inhalation is associated with activation of NF-kappa B. *Environ Health Perspect*. 106 Suppl 5 (1998) 1175-8.
- [184]. J. Kidde, A.M. Gorabi, T. Jamialahmadi, A. Sahebkar. COVID-19 Is an Endothelial Disease: Implications of Nitric Oxide. *Adv Exp Med Biol*. 1321 (2021) 109-113
- [185]. J.E. Freedman, J. Loscalzo. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost*. 1(6) (2003) 1183-8.
- [186]. M. André, E. Felley-Bosco. Heme oxygenase-1 induction by endogenous nitric oxide: influence of intracellular glutathione. *FEBS Lett*. 546(2-3) (2003) 223-7
- [187]. N. Olson, A. van der Vliet. Interactions between nitric oxide and hypoxia-inducible factor signaling pathways in inflammatory disease. *Nitric Oxide*. 25(2) (2011) 125-37.
- [188]. B. Jiang, Y. Su, Q. Chen, L. Dong, W. Zhou, H. Li, Y. Wang. Protective Effects of Ozone Oxidative Postconditioning on Long-term Injury After Renal Ischemia/Reperfusion in Rat. *Transplant Proc*. 52(1) (2020) 365-372.
- [189]. C. Peralta, O.S. León, C. Xaus, N. Prats, E.C. Jalil, E.S. Planell, P. Puig-Parellada, E. Gelpí, J. Roselló-Catafau. Protective effect of ozone treatment on the injury associated with hepatic ischemia-reperfusion: antioxidant-prooxidant balance. *Free Radic Res*. 31(3) (1999) 191-6.
- [190]. L. Wang, Z. Chen, X. Weng, M. Wang, Y. Du, X. Liu. Combined Ischemic Postconditioning and Ozone Postconditioning Provides Synergistic Protection Against Renal Ischemia and Reperfusion Injury Through Inhibiting Pyroptosis. *Urology*. 123 (2019) 296.e1-296.e8
- [191]. C. Elsurer, M. Onal, N. Selimoglu, O. Erdur, M. Yilmaz, E. Erdogan, O. Kal, J.B. Celik, O. Onal. Postconditioning Ozone Alleviates Ischemia-Reperfusion Injury and Enhances Flap Endurance in Rats. *J Invest Surg*. 33(1) (2000) 15-24.
- [192]. E. Barber, S. Menéndez, O.S. León, M.O. Barber, N. Merino, J.L. Calunga, E. Cruz, V. Bocci. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators Inflamm*. 8(1) (1999) 37-41.
- [193]. C. Peralta, C. Xaus, R. Bartrons, O.S. Leon, E. Gelpi, J. Roselló-Catafau. Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radic Res*. 33(5) (2000) 595-605
- [194]. H. Ajamieh, N. Merino, E. Candelario-Jalil, S. Menéndez, G. Martinez-Sanchez, L. Re, A. Giuliani, O.S. Leon. Similar protective effect of ischaemic and ozone oxidative preconditionings in liver ischaemia/reperfusion injury. *Pharmacol Res*. 45(4) (2002) 333-9.
- [195]. H.H. Ajamieh, S. Menéndez, G. Martínez-Sánchez, E. Candelario-Jalil, L. Re, A. Giuliani, O.S. Fernández. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia-reperfusion. *Liver Int*. 24(1) (2004) 55-62.

- [196]. H.A. Cai, X. Tao, L.J. Zheng, L. Huang, Y. Peng, R.Y. Liao, Y.M. Zhu. Ozone alleviates ischemia/reperfusion injury by inhibiting mitochondrion-mediated apoptosis pathway in SH-SY5Y cells. *Cell Biol Int.* 44(4) (2020) 975-984.
- [197]. M.B. Malas, I.N. Naazie, N. Elsayed, A. Mathlouthi, R. Marmor, B. Clary. Thromboembolism risk of COVID-19 is high and associated with a higher risk of mortality: A systematic review and meta-analysis. *EClinical Medicine.* 29 (2020) 100639.
- [198]. K. Boonyawat, P. Chantrathammachart, P. Numthavaj, N. Nanthatanti, S. Phusanti, A. Phuphuakrat, P. Niparuck, P. Angchaisuksiri. Incidence of thromboembolism in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Thromb J.* 18(1) (2020) 34.
- [199]. The Lancet Haematology. COVID-19 and thrombosis: a continuing story. *Lancet Haematol.* 8(2) (2021) e95.
- [200]. T.C. Hanff, A.M. Mohareb, J. Giri, J.B. Cohen, J.A. Chirinos. Thrombosis in COVID-19. *Am J Hematol.* 95(12) (2020) 1578-1589.
- [201]. T. Kander. Coagulation disorder in COVID-19. *Lancet Haematol.* 7(9) (2020) e630-e632
- [202]. V.E. Hjortdal, T. Sinclair, C.L. Kerrigan, S. Solymoss. Arterial ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg.* 93(2) (1994) 375-85
- [203]. O. Rokitansky, A. Rokitansky, J. Steiner, et al. Ozontherapie bei peripheren, arteriellen. Durchblutungsstörungen: klinik, biochemische und blutgasanalytische untersuchungen. In: Wasser, IOA, ed. *Ozon-Weltkongress.* Berlin: 1981: 53-75.
- [204]. R. Giunta, A. Coppola, C. Luongo, A. Sammartino, S. Guastafierro, A. Grassia, L. Giunta, L. Mascolo, A. Tirelli, L. Coppola. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. *Ann Hematol.*;80(12) (2001) 745-8.
- [205]. J.F. Ndisang. Synergistic Interaction Between Heme Oxygenase (HO) and Nuclear-Factor E2- Related Factor-2 (Nrf2) against Oxidative Stress in Cardiovascular Related Diseases. *Curr Pharm Des.* 23(10) (2017) 1465-1470
- [206]. O. Onal, F. Yetisir, A.E. Sarer, N.D. Zeybek, C.O. Onal, B. Yurekli, H.T. Celik, A. Sirma, M. Kilic. Prophylactic Ozone Administration Reduces Intestinal Mucosa Injury Induced by Intestinal Ischemia-Reperfusion in the Rat. *Mediators Inflamm.* 2015 (2015) 792016
- [207]. R. Schulz, M. Kelm, G. Heusch. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 61(3) (2004) 402-13
- [208]. S. Pandolfi, A. Zammiti, M. Franzini, V. Simonetti, W. Liboni, L. Valdenassi, F. Molinari. Oxygen-ozone therapy in prevention and rehabilitation of myocardium infarct. *Ozone Ther* 3(1) (2018) 7512
- [209]. C. Di Filippo, M. Luongo, R. Marfella, F. Ferraraccio, B. Lettieri, A. Capuano, F. Rossi, M. D'Amico. Oxygen/ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of eNOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 382(3) (2010) 287-91
- [210]. J. Whitsett, M.J. Picklo Sr, J. Vasquez-Vivar. 4-Hydroxy-2-nonenal increases superoxide anion radical in endothelial cells via stimulated GTP cyclohydrolase proteasomal degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(11) (2007) 2340-7.
- [211]. K. Chen, M.D. Maines. Nitric oxide induces heme oxygenase-1 via mitogen-activated protein kinases ERK and p38. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 46(3) (2000) 609-17

- [212]. Y. Dere Günal, Ö. Boybeyi Türer, P. Atasoy, Ü Kısa, M.K. Aslan. The effects of ozone on the acute phase of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 26(5) (2020) 651-656. English. doi: 10.14744/tjtes.2020.48672.
- [213]. V. Bocci. Autohaemotherapy after treatment of blood with ozone. A reappraisal. *J Int Med Res.* 22(3) (1994) 131-44
- [214]. J.E. Freedman, J. Loscalzo. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J Thromb Haemost.* 1(6) (2003) 1183-8.
- [215]. S.K. Karmohapatra, K. Chakraborty, N.N. Kahn, A.K. Sinha. The role of nitric oxide in aspirin induced thrombolysis in vitro and the purification of aspirin activated nitric oxide synthase from human blood platelets. *Am J Hematol.* 82(11) (2007) 986-95.
- [216]. P. Canzano, M. Brambilla, B. Porro, N. Cosentino, E. Tortorici, S. Vicini, P. Poggio, A. Cascella, M.F. Pengo, F. Veglia, S. Fiorelli, A. Bonomi, V. Cavalca, D. Trabattoni, D. Andreini, E. Omodeo Salè, G. Parati, E. Tremoli, M. Camera. Platelet and Endothelial Activation as Potential Mechanisms Behind the Thrombotic Complications of COVID-19 Patients. *JACC Basic Transl Sci.* 6(3) (2021) 202-218
- [217]. A. Solovey, R. Kollander, L.C. Milbauer, F. Abdulla, Y. Chen, R.J. Kelm Jr, R.P. Hebbel. Endothelial nitric oxide synthase and nitric oxide regulate endothelial tissue factor expression in vivo in the sickle transgenic mouse. *Am J Hematol.* 85(1) (2010)41-5
- [218]. W.R. Zhang, M. Sun, J.K. Luo. [Serum nitric oxide and D-dimer before and after administering antihypertensive drugs in essential hypertension]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2003 Aug;28(4):382-4.
- [219]. G. Valacchi, V. Bocci. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells *Med Inflamm* 9 (2000) 271-276
- [220]. C. Foglieni, A. Fulgenzi, D. Belloni, C. Sciorati, E. Ferrero, M.E. Ferrero. Ozonated autohemotherapy: protection of kidneys from ischemia in rats subjected to unilateral nephrectomy. *BMC Nephrol.* 12 (2011) 61.
- [221]. R.B. Devlin, K.E. Duncan, M. Jardim, M.T. Schmitt, A.G. Rappold, D. Diaz-Sanchez. Controlled exposure of healthy young volunteers to ozone causes cardiovascular effects. *Circulation.* 126(1) (2012) 104-11
- [222]. D. Pellegrini, R. Kawakami, G. Guagliumi, A. Sakamoto, K. Kawai, A. Gianatti, A. Nasr, R. Kutys, L. Guo, A. Cornelissen, L. Faggi, M. Mori, Y. Sato, I. Pescetelli, M. Brivio, M. Romero, R. Virmani, A.V. Finn. Microthrombi as a Major Cause of Cardiac Injury in COVID-19: A Pathologic Study. *Circulation.* 143(10) (2021) 1031-1042.
- [223]. K. Franke, K. Curth, J. Lenart, D. Knochenhauer, T. Kietzmann. Enhanced plasminogen activator inhibitor-1 expression in transgenic mice with hepatocyte-specific overexpression of superoxide dismutase or glutathione peroxidase. *Antioxid Redox Signal.* 6(4) (2004) 721-8
- [224]. S.J. Chapple, X. Cheng, G.E. Mann. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol.* 1(1) (2013) 319-31
- [225]. C. Gutmann, R. Siow, A.M. Gwozdz, P. Saha, A. Smith. Reactive Oxygen Species in Venous Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 21(6) (2020) 1918

- [226]. S.M. Al-Dalain, G. Martínez, E. Candelario-Jalil, S. Menéndez, L. Re, A. Giuliani, O.S. León. Ozone treatment reduces markers of oxidative and endothelial damage in an experimental diabetes model in rats. *Pharmacol Res.* 44(5) (2001) 391-6.
- [227]. C. Di Filippo, R. Marfella, P. Capodanno, F. Ferraraccio, L. Coppola, M. Luongo, L. Mascolo, C. Luongo, A. Capuano, F. Rossi, M. D'Amico. Acute oxygen-ozone administration to rats protects the heart from ischemia reperfusion infarct. *Inflamm Res.* 2008 Oct;57(10) (2008) 445-9.
- [228]. C. Di Filippo, M. Luongo, R. Marfella, F. Ferraraccio, B. Lettieri, A. Capuano, F. Rossi, M. D'Amico. Oxygen/ozone protects the heart from acute myocardial infarction through local increase of eNOS activity and endothelial progenitor cells recruitment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010 Sep;382(3):287-91.
- [229]. T. Jiang, Y. Liu, B. Chen, L.Si. Identification of potential molecular mechanisms and small molecule drugs in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Braz J Med Biol Res.* (2020) 53(9):0.
- [230]. Z. Wang, A. Zhang, W. Meng, T. Wang, D. Li, Z. Liu, H. Liu. Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2018 Sep 15 (2018) 835:82-93.
- [231]. M.E. Fernández-Cuadros, M.J. Albaladejo-Florín, S. Álava-Rabasa, J. Gallego-Galiana, G.F. Pérez-Cruz, I. Usandizaga-Elio, E. Pacios, D.E. Torres-García, D. Peña-Lora, L. Casique-Bocanegra, M.J. López-Muñoz, J. Rodríguez-de-Cía, O.S. Pérez-Moro. Compassionate Use of Rectal Ozone (O<sub>3</sub>) in Severe COVID-19 Pneumonia: a Case-Control Study. *SN Compr Clin Med.* Mar 22 (2021) 1-15. doi: 10.1007/s42399-021-00849-9.
- [232]. M.E. Fernández-Cuadros, M.J. Albaladejo-Florín, S. Álava-Rabasa, I. Usandizaga-Elio, D. Martinez-Quintanilla Jimenez, D. Peña-Lora, I. Neira-Borrajo, M.J. López-Muñoz, J. Rodríguez-de-Cía, O.S. Pérez-Moro. Effect of Rectal Ozone (O<sub>3</sub>) in Severe COVID-19 Pneumonia: Preliminary Results. *SN Compr Clin Med.* 3 (2020) 1-9.
- [233]. J. Wu, C.S. Tan, H. Yu, Y. Wang, Y. Tian, W. Shao, Y. Zhang, K. Zhang, H. Shao, G. Ni, J. Shen, A.C. Galoforo, Q. Wu, D. Ming. Recovery of Four COVID-19 Patients via Ozonated Autohemotherapy. *Innovation (N Y).* 1(3) (2020) 100060.

Table 1A. Recent clinical studies and in progress trials on the application of ozone therapy (O <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> -AHT) against COVID-19										
STUDY		SAMPLING		OZONE METHOD		MAIN RESULTS				REFERENCES
Case study	50 male patients COVID-19 positive in ITUs, mean age 75		200 ml 45 µg/ml O <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> MAHT (SIOOT protocol)		↓	IL-6, inflammatory markers, LDH, CRP, D-dimer				[3]
					↑	SatO <sub>2</sub> %, PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> , time of hospitalization				
RCT	60 patients, aged 30-60, both sexes, with mild to moderate COVID-19		150 ml 40 µg/ml O <sub>3</sub> twice daily rectal insufflation plus 5 ml 25 µg/ml O <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> mAHT		↑	Cases of negative SARS-CoV2 RT-PCR (100% on day 10 following treatment), relieved breathlessness, SpO <sub>2</sub>				[4]
					↓	CRP, LDH., ferritin, hospitalization times				
Prospective case control study	18 patients, (9 controls + 9 treated), COVID-19 infected and hospitalized		O <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> MAHT 200 mL blood O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> mixture and O <sub>3</sub> 40 µg/mL		↓	Days of hospitalization. Ferritin, CRP, D-dimer, LDH				[5]
2 case reports	Patient 1 male 53 yrs COVID-19 with pneumonia		O <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> MAHT O <sub>3</sub> conc not specified		↓	CRP, LDH				[7]
	Patient 2 male 66 yrs COVID-19 severe pneumonia				↑	Leukocyte, PaO <sub>2</sub> , SatO <sub>2</sub> % ,				
					↓	CRP, LDH				
					↑	PaO <sub>2</sub> , SatO <sub>2</sub> %				
Case control study	14 + 14 (treated/control) patients positive for COVID-19		150 mL at a concentration of 35 µg/mL for 5 to 10 days		↑	Oxygen saturation %, lymphocytes %				[10]
					↓	Fibrinogen, D-dimer, LDH, CRP, IL-6, Taylor scale				
Current clinical trials and trial plannings										
Interventional RCT	208 participants COVID-19		100-200ml of blood with O <sub>3</sub> 40 µg / mL 200 ml every 12h during 5 days.		↑	Rate of improvements at 14 days (1 end point) Clinical condition (1 end point)				NCT04370223
					↓	Mortality at 28 days (2 end point)				
Interventional RCT	50 participants COVID-19 crossover assignment		200 mL O <sub>3</sub> 40 µg/mL of medical O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> in 200 mL		↑	COVID-19 clinical scale (1 end point) 3 weeks				NCT04359303
					↓	Mortality at 21 days (2 end point)				
Observational cohort prospective	25 patients COVID-19 with pneumonia		200 mL O <sub>3</sub> 40 µg/mL of medical O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> in 200 mL		↑	Clinical state (1 end point)				NCT04789395
					↓	Mortality (2 end point)				
Table 1B. Major investigated markers in the recent clinical studies on O <sub>3</sub> in COVID-19										
STUDY		METHOD OZONE	IL-6	CRP	D-DIMER	LDH	PAO2/FI02	SATO2%	DAYS	REFERENCES
1	4 case reports	Rectal	48,7	1,1	1965	253		89		[232]

		100 mL of rectal ozone, at a concentration of 35 µg/mL for 5 to 10 days,	8,2 ↓ 83.16%	0,85 ↓ 22.73%	585,5 ↓ 70,20%	210 ↓ 16,99%		97,5 ↑ 9,55%		
2	Case control study on 14 patients	8 sessions (1 session/day) of intra-rectal ozone (150 mL volume, 35 µg/mL concentration [5.25mg total dose])			3240 1343 ↓58,55%			92.96 94.3 ↑1,44%	35.67 28.58 ↓19.88%	[10]
3	Case study	50 O2-O3-AHT 45 ug	660 90 ↓ 86,36%	15 5 ↓ 66,67%	1250 500 ↓60.00%	350 290 ↓17.14%		80 95 ↑18.75%		[3]
4	RCT	60 40 ug 150 2 v al di con mini emo		0.98 0.85 ↓ 5.55%		944.0 752.6 ↓ 20.27%		96.4 97 ↑0.62%		[4]
5	Prospective case control study	18 patients 200 ml 40 ug			943 389 ↓58.75%	4,3 2,9 ↓ 32.56%				[5]
7	4 case report	100 ml 40 ug	166,4 10,1 ↓ 93.93%	300 10,2 ↓ 96.6%						[233]
8	Clinical trial	200 ml 40 ug 60 pat 30 +30	44 33 ↓ 25.00%	76,4 67,6 ↓ 11.51%						[8]
9	Case control study	28 (14 +14) 30 ug	104,5 44,57 ↓ 57.34%	164,54 46,40 ↓ 71.80%	1187 914,8 ↓ 22.93%					[9]

↓ reduction respect to control or before treatment; ↑ increase respect to control or before treatment.

Statistical power for each evaluated parameter. 1) effect of O<sub>3</sub> on inflammation = reduction of 80% (power 0.80, p =0.04878); Effect of O<sub>3</sub> on coagulation reduction of 56.53% (power 0.50, p = 0.055556). Effect size: Hedges (SMD) fixed effect model = 1.54 ; CI<sub>95</sub> = [0.963,2.122] z score = 5.215 p <0.0001 I<sup>2</sup>=97.89999999999999%, Chi<sup>2</sup>=193.4, random effect model = 9.07; random effect model = 9.07; CI<sub>95</sub> = [3.756,14.376], z score = 3.346, p =0.000819 I<sup>2</sup> =97.89999999999999%, Tau<sup>2</sup>=32.7

The evaluation shows a high heterogeneity and a large effect size (Rosenberg, M. S. (2005). The file-drawer problem revisited: a general weighted method for calculating fail-safe

numbers in meta-analysis. Evolution, 59(2), 464-468.

LEGEND CRP: C-reactive protein; ITUs : intensive therapy units; O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>-MAHT: major oxygen-ozone autohemotherapy; O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>-mAHT: minor oxygen-ozone autohemotherapy SIOOT: Italian Society of Oxygen Ozone Therapy; SatO<sub>2</sub>% : percentage of oxygen saturation; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> the ratio of arterial oxygen partial pressure (PaO<sub>2</sub> in mmHg) to fractional inspired oxygen (FiO<sub>2</sub> expressed as a fraction, not a percentage), SpO<sub>2</sub>: oxygen saturation

Table 2. Major historical studies on the effect of O<sub>3</sub> on ischemia/reperfusion (I/R) injury models

RESEARCH MODEL FUNCTION	RATIONALE AND METHOD	OZONE METHOD		MAIN RESULTS	REFERENCES
Rat	Male Wistar rats (8-10 weeks old, 250-280 g weight) Renal I/R	2.5 to 2.6 mL O <sub>2</sub> /O <sub>3</sub> mixture ozone concentration 50 mg/L, 0.5 mg/kg/rat) by rectal insufflation via a polyethylene cannula	↓	Damage score	[188]
			↑	Serum creatinine, blood urea nitrogen (BUN) SOD, MDA, MPO	
	Male Wistar rats Liver I/R 90 min right-lobe hepatic ischemia and 90 min reperfusion.	O <sub>3</sub> as 1.0 mg/kg. 10 O <sub>3</sub> treatments, 1/day, 5.0-5.5 ml O <sub>3</sub> 50 µg/ml	↓	I/R caused injury, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[189]
			↑	SOD, GSH	
	Sprague-Dawley rats I/R model unilateral nephrectomy with 45 min ischemia and 24 hrs reperfusion	O <sub>3</sub> post-conditioning 2 mg/kg	↓	I/R induced damage, IL-1β, IL18, caspase 1, 11	[190]
			↑	Serum creatinine, BUN	
	Wistar rats I/R axillary artery ligation 3 hrs, reperfusion 24 hrs	O <sub>2</sub> -O <sub>3</sub> mixture (97% O <sub>2</sub> , 3% O <sub>3</sub> , O <sub>3</sub> 60 µg/ml)	↑	CAT, SOD, GSH-Px, MDA, PCO, TAC	[191]
			↓	I/R caused damage, TOS	
	Male Wistar rats renal ischemia 30 min, reperfusion 3 hrs	15 O <sub>3</sub> treatments for rectal insufflation (50 µg/ml) O <sub>3</sub>	↑	Renal function (plasma clearance of <i>p</i> -ammino hippurate), SOD	[192]
			↓	Phospholipase A, necrotic damage	
Male Wistar rats liver right lobe acute ischemia 90 min, reperfusion 24 hrs	10 O <sub>3</sub> treatments, one per day, 5.0-5.5 ml concentration 50 µg/ml	↓	Transaminase level, xanthine accumulation, increase in ADA from ischemia	[193]	
Male Wistar rats liver right lobe acute ischemia 90 min, reperfusion 90 min	15 O <sub>3</sub> treatments, one per day, 5.0-5.5 ml concentration 50 µg/ml	↓	Ischemia induced amage	[194]	
Male Wistar rats liver right lobe acute ischemia 90 min, reperfusion 90 min	15 O <sub>3</sub> treatments, one per day, 5.0-5.5 ml concentration 50 µg/ml	↑	Liver protection via mechanisms producing NO	[195]	
SH-SY5Y cell line	<i>In vitro</i> neuroblastoma cell line	4 × 10 <sup>5</sup>	↓	Mitochondria-mediated apoptosis	[196]

	SH-SY5Y in cerebral I/R model	SH-SY5Y cells in 1 mL medium with 1 ml O <sub>3</sub> in 10 mL	↑	SOD, CAT, GSH-Px	
--	-------------------------------	--	---	------------------	--

ADA; adenosine deaminase; CAT: catalase; GSH-Px: glutathione peroxidase; MDA: malonyldialdehyde; MPO: myeloperoxidase; PCO: protein carbonyl; SOD: superoxide dismutase; TAC: total antioxidant capacity; TOS: total oxidant status.



