



Saint Camillus International University of Health and Medical Sciences

Master di II Livello
in
Ossigeno Ozono Terapia

“Il ruolo dell’Ossigeno Ozono Terapia nella neuroprotezione: razionale, evidenze e prospettive”

Relatore:
Prof. Sergio PANDOLFI

Candidato:
Dott. Rebecca MASSIA

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pg. 3
2.1 I MECCANISMI DI DANNO NEURONALE E RAZIONALE PER L'UTILIZZO DELL'OSSIGENO OZONO TERAPIA	Pg.4
2.2 IL RUOLO DEL FATTORE Nrf2 NELLA NUROPROTEZIONE MEDIATA DALL'OSSIGENO OZONO TERAPIA	Pg.6
2.3 EVIDENZE SPERIMENTALI RECENTI	Pg.8
2.4 EVIDENZE CLINICHE SU PAZIENTE TRATTATI CON OSSIGENO OZONO TERAPIA	Pg.10
2.5 CONFRONTO CON ALTRE TERAPIE NEUROPROTETTIVE	Pg.12
2.6 EFFETTI IMMUNOMODULANTI E SULLA MICROGLIA	Pg.14
2.7 APPLICAZIONE IN NEUROCHIRURGIA E RIABILITAZIONE	Pg.16
3. CONCLUSIONI	Pg.18

1. INTRODUZIONE

La neuroprotezione rappresenta una delle principali frontiere della neurologia clinica e sperimentale. Si definisce come l'insieme di interventi finalizzati a prevenire o rallentare i processi di degenerazione neuronale, con l'obiettivo di salvaguardare la funzionalità e l'integrità strutturale del sistema nervoso centrale (SNC) in presenza di eventi acuti (ictus, trauma cranico) o condizioni cronico-progressive (malattie neurodegenerative, patologie demielinizzanti) deterioramento cognitivo demenza senile vascolare

I meccanismi fisiopatologici coinvolti nel danno neuronale comprendono: l'ischemia e l'ipossia tissutale, l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la disfunzione mitocondriale, l'attivazione di cascate biochimiche che vede la produzione di citochine infiammatorie e pro-apoptotiche, nonché la rottura della barriera ematoencefalica (BEE). Questi eventi convergono in un danno ossidativo e infiammatorio a carico di neuroni, astrociti e oligodendrociti, amplificando la vulnerabilità del parenchima cerebrale.

In tale contesto, l'ossigeno-ozono terapia si propone come una strategia integrativa con potenziale neuroprotettivo. L'ozono (O_3), gas triatomico instabile, è somministrato in miscela con ossigeno medico (O_2) in concentrazioni controllate, tipicamente comprese tra 10 e 40 $\mu g/ml$, mediante diverse vie di somministrazione. Tra queste, la tecnica più studiata e applicata in ambito neurologico è l'autoemoinfusione maggiore (GAEI - Grande AutoEmoInfusione). Tale procedura prevede il prelievo di 100–200 mL di sangue venoso, la sua ozonizzazione extracorporea con una miscela gassosa O_2 - O_3 (in un circuito chiuso e sterile) e la successiva reinfusione endovenosa del sangue trattato nel paziente.

La GAEI induce un "mild oxidative stress" sistemico che, pur non provocando danno diretto, stimola l'attivazione di risposte adattative citoprotettive. In particolare, l'ozono attiva il pathway Nrf2/Keap1/ARE, promuovendo l'espressione di enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, catalasi, glutatione perossidasi) e citoprotettivi. Allo stesso tempo, esercita un'azione immunomodulante attraverso l'inibizione del fattore di trascrizione NF- κ B e la conseguente riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-6).

Numerosi studi clinici e preclinici hanno dimostrato che la GAEI con ossigeno-ozono può migliorare la perfusione cerebrale, aumentare la disponibilità di ossigeno a livello mitocondriale,

ridurre i livelli di stress ossidativo sistemico e favorire il recupero funzionale in patologie neurologiche croniche e non. In pazienti con sclerosi multipla, ad esempio, sono stati osservati miglioramenti della circolazione cerebrale valutati con NIRS e Doppler transcranico, accompagnati da una riduzione dei marcatori infiammatori e ossidativi. Simili risultati sono stati riportati in pazienti con ictus ischemico acuto trattati con GAEI nelle prime 24-72 ore dall'esordio.

Questa tesi si propone di analizzare in maniera sistematica e critica il potenziale neuroprotettivo dell'ossigeno-ozono terapia, focalizzandosi in particolare sui meccanismi molecolari attivati dalla GAEI, sulle evidenze cliniche disponibili, sul confronto con le terapie neuroprotettive convenzionali e sulle applicazioni in ambito neurochirurgico e riabilitativo.

2.1 Meccanismi di danno neuronale e razionale per l'utilizzo dell'ossigeno-ozono terapia

Il danno neuronale è un evento patologico complesso e multifattoriale, che coinvolge una cascata di processi biochimici e molecolari in grado di compromettere la vitalità e la funzione delle cellule nervose. Sebbene le manifestazioni cliniche siano spesso eterogenee e dipendenti dalla patologia sottostante, i meccanismi patogenetici alla base del danno neuronale presentano elementi comuni riconducibili a quattro principali processi interconnessi: ischemia, stress ossidativo, neuroinfiammazione e disfunzione mitocondriale.

Ischemia e ipossia cerebrale

L'ischemia cerebrale rappresenta una delle principali cause di danno neuronale acuto. Essa è caratterizzata dalla riduzione critica del flusso sanguigno cerebrale (cerebral blood flow, CBF), che determina un'insufficiente fornitura di ossigeno e glucosio, indispensabili per il metabolismo energetico neuronale. Quando il CBF scende al di sotto della soglia critica di 18–20 ml/100g/min, si attiva una cascata ischemica che comporta la deplezione di ATP, il collasso del gradiente ionico transmembrana, l'accumulo extracellulare di glutammato e l'attivazione dei recettori NMDA. Quest'ultimo fenomeno conduce a un ingresso massivo di ioni calcio nei neuroni, stimolando enzimi litici (proteasi, fosfolipasi, endonucleasi) che degradano strutture cellulari fondamentali.

Stress ossidativo e radicali liberi

Uno degli effetti immediati dell'ischemia-riperfusion è l'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS). Questi radicali liberi sono generati soprattutto nei

mitocondri, a livello della catena di trasporto elettronico, durante il tentativo di ristabilire il metabolismo aerobico. I ROS — tra cui l'anione superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2), il radicale idrossilico ($OH^\bullet$) — reagiscono con i lipidi delle membrane neuronali, generando prodotti tossici come la malondialdeide (MDA) e il 4-idrossinonenale (4-HNE), che inducono perossidazione lipidica, danneggiamento del DNA e inattivazione di enzimi cruciali.

Infiammazione neurogliale

L'ischemia e lo stress ossidativo innescano un'intensa risposta infiammatoria, mediata dalla microglia attivata e dagli astrociti reattivi. L'infiltrazione leucocitaria e l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B promuovono la produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 β , IL-6), chemochine e molecole di adesione. Questo ambiente pro-infiammatorio contribuisce alla rottura della barriera emato-encefalica (BEE), favorendo l'edema vasogenico e l'infiltrazione di cellule immunitarie periferiche, amplificando il danno neuronale.

Disfunzione mitocondriale e apoptosi

La disfunzione mitocondriale costituisce un ulteriore nodo patogenetico centrale. Il danneggiamento delle membrane mitocondriali induce la liberazione di citocromo c, che attiva la cascata delle caspasi e avvia l'apoptosi neuronale. Inoltre, l'alterata produzione di ATP e l'accumulo di ROS all'interno dei mitocondri peggiorano ulteriormente la compromissione metabolica e la vitalità cellulare.

Razionale per l'utilizzo dell'ossigeno-ozono terapia

Alla luce dei meccanismi sopra descritti, appare evidente come un trattamento realmente neuroprotettivo debba intervenire su più fronti: migliorare l'ossigenazione tissutale, ridurre il carico ossidativo, modulare la risposta infiammatoria e sostenere la funzione mitocondriale, attivare il turn over delle cellule staminali cerebrali. L'ossigeno-ozono terapia, in particolare somministrata tramite autoemoinfusione maggiore, si configura come una strategia biologicamente plausibile ed efficace, proprio perché agisce simultaneamente su questi bersagli molecolari.

A livello microcircolatorio, l'ozono aumenta la deformabilità eritrocitaria, riduce la viscosità del sangue e migliora la fluidità ematica, facilitando il trasporto di ossigeno nei distretti ischemici attiva il rilascio di ossido nitrico tissutale con incremento del flusso a livello del microcircolo. In studi su modelli animali di stroke, il trattamento con O₂-O₃ ha mostrato un incremento del flusso cerebrale regionale fino al 40%, con una significativa riduzione dell'area infartuata.

Sul versante dello stress ossidativo, l'ozono induce l'attivazione del sistema antiossidante endogeno tramite l'attivazione del pathway Nrf2-Keap1-ARE. Questo comporta un aumento dell'espressione di enzimi come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutathione perossidasi (GPx), con una riduzione documentata dei livelli di MDA e 4-HNE fino al 50% rispetto ai controlli.

Inoltre, la terapia con ozono modula la risposta immunitaria, riducendo la produzione di citochine pro-infiammatorie e l'attività della microglia. Studi sperimentali hanno dimostrato una diminuzione dell'espressione di NF-κB nei tessuti cerebrali trattati con ozono, accompagnata da una stabilizzazione della BEE e da una minore attivazione astrocitaria.

Infine, a livello mitocondriale, l'ozono ha dimostrato di preservare la funzione della catena respiratoria, migliorare l'efficienza del ciclo di Krebs e ridurre l'attivazione della cascata apoptotica, come evidenziato dalla ridotta attivazione della caspasi-3 e dall'inibizione della permeabilizzazione della membrana mitocondriale in modelli di ischemia cerebrale.

2.2 Il ruolo del fattore Nrf2 nella neuroprotezione mediata dall'ossigeno-ozono terapia

Il fattore di trascrizione Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) rappresenta uno dei principali regolatori della risposta antiossidante cellulare ed è considerato un attore con un ruolo centrale nei meccanismi di protezione contro lo stress ossidativo, le neurotossine ambientali e i processi infiammatori cronici. L'interesse verso Nrf2 in ambito neurologico è cresciuto esponenzialmente negli ultimi anni, poiché numerosi studi hanno dimostrato il suo ruolo fondamentale nella difesa del sistema nervoso centrale (SNC) nei confronti del danno ischemico e neurodegenerativo.

Meccanismo di attivazione del pathway Nrf2/Keap1/ARE

In condizioni fisiologiche, Nrf2 è sequestrato nel citoplasma dalla proteina Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), che ne facilita la degradazione proteasomica attraverso la via ubiquitina-

dipendente. Tuttavia, in presenza di un moderato stimolo ossidativo — come quello indotto da basse dosi di ozono medicale — si verifica un'ossidazione dei residui di cisteina di Keap1, con conseguente dissociazione del complesso Nrf2-Keap1. Nrf2, liberato, trasloca nel nucleo e si lega agli elementi di risposta antiossidante (ARE – Antioxidant Response Elements), presenti nei promotori di numerosi geni detossificanti e citoprotettivi.

L'attivazione del pathway Nrf2 porta alla trascrizione e successiva traduzione di una vasta gamma di proteine coinvolte nella neutralizzazione dei radicali liberi e nella rigenerazione dei sistemi redox cellulari, tra cui: superossido dismutasi (SOD), catalasi (CAT), glutatione perossidasi (GPx), NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1), eme ossigenasi-1 (HO-1) e glutatione S-transferasi (GST). La sinergia funzionale di questi enzimi permette di ristabilire l'omeostasi ossidativa intracellulare, prevenendo la perossidazione lipidica, l'ossidazione delle proteine e il danneggiamento del DNA.

L'attivazione del Nrf2 tramite ossigeno-ozono: effetto preconditionante

L'ossigeno-ozono terapia induce un cosiddetto eustress controllato o preconditionamento ossidativo, ovvero una stimolazione moderata dei sistemi redox in grado di attivare risposte adattative cellulari protettive. Tale effetto è stato descritto come una delle chiavi dell'efficacia dell'ozonoterapia. Diversi studi preclinici hanno dimostrato che l'esposizione a dosi terapeutiche di ozono (10–30 µg/mL) determina un aumento significativo della traslocazione nucleare di Nrf2 entro 1–3 ore dalla somministrazione, con picchi di espressione genica degli enzimi antiossidanti tra le 6 e le 24 ore successive.

Ad esempio, in modelli animali di ischemia cerebrale transitoria, il pre-trattamento con ozono ha prodotto un incremento dell'attività della superossido dismutasi (SOD) del 35–40%, un aumento della catalasi del 30% e della glutatione perossidasi del 25%, rispetto ai controlli. Parallelamente, si è osservata una riduzione significativa dei livelli plasmatici e tissutali di malondialdeide (MDA) — un marcatore della perossidazione lipidica — fino al 50% in soggetti trattati.

Questi dati indicano che l'attivazione di Nrf2 non è solo un effetto molecolare accessorio dell'ozonoterapia, ma rappresenta un vero e proprio meccanismo bersaglio della sua azione protettiva. La stimolazione della trascrizione ARE-dipendente non solo rafforza le difese antiossidanti endogene, ma contribuisce alla stabilizzazione della barriera ematoencefalica, alla riduzione dell'edema cerebrale e alla prevenzione del danno neuronale apoptotico.

Ruolo di Nrf2 nella neurogenesi e nella protezione delle cellule gliali

Oltre alla sua funzione antiossidante, Nrf2 svolge un ruolo di rilievo nel mantenimento della plasticità neurale e della funzione delle cellule gliali. Studi recenti hanno dimostrato che l'attivazione del pathway Nrf2 stimola la proliferazione delle cellule staminali neurali (NSPCs) che risiedono nell'ippocampo, favorendo la neurogenesi endogena, particolarmente nella zona subgranulare del giro dentato. Questo fenomeno è di particolare interesse nei processi di riparazione tissutale post-insulto ischemico o post-infiammazione.

Inoltre, Nrf2 modula l'attivazione microgliale, contribuendo a limitare la polarizzazione verso fenotipi pro-infiammatori (M1) e promuovendo uno stato anti-infiammatorio (M2), caratterizzato dalla produzione di fattori trofici e dalla fagocitosi selettiva di detriti neuronali. Questo effetto, se supportato dall'ozonoterapia, può giocare un ruolo determinante nel contenimento del danno secondario post-ischemico e nella prevenzione della neurodegenerazione cronica.

Considerazioni cliniche e prospettive future

L'interesse clinico per l'attivazione del pathway Nrf2 attraverso l'ozonoterapia è giustificato dalla possibilità di modulare efficacemente la risposta ossidativa e infiammatoria in modo fisiologico, senza l'impiego di farmaci antiossidanti esogeni che, in alcuni casi, si sono rivelati poco efficaci o addirittura controproducenti. Il preconditionamento ossidativo indotto dalla miscela di O_2-O_3 rappresenta una forma elegante e naturale di stimolazione endogena delle difese neuronali.

Ad oggi, diversi studi clinici preliminari e osservazionali hanno riportato benefici associati alla GAEI in pazienti neurologici, con miglioramenti della sintomatologia clinica, della performance neurocognitiva e dei marcatori biologici dello stress ossidativo. Tuttavia, mancano ancora trial clinici randomizzati di ampia scala che possano confermare l'efficacia e la sicurezza dell'ozonoterapia come strumento mirato all'attivazione di Nrf2 in ambito neurologico.

2.3 Evidenze sperimentali da studi cinesi

Negli ultimi anni, diversi gruppi di ricerca cinesi hanno prodotto un corpo crescente di studi sperimentali sul potenziale neuroprotettivo dell'ossigeno-ozono terapia, contribuendo in modo significativo alla comprensione dei meccanismi molecolari implicati. Le ricerche si sono

concentrate soprattutto su modelli animali di ischemia cerebrale, neuroinfiammazione e danno da stress ossidativo, fornendo dati quantitativi solidi a sostegno dell'efficacia dell'ozono medicale nel preservare l'integrità del sistema nervoso centrale.

Studio di Huang et al. (2023): Ischemia cerebrale e autofagia astrocitaria

In uno studio pubblicato nel 2023 su *Annals of Translational Medicine*, Huang e colleghi hanno utilizzato un modello murino di ischemia cerebrale transitoria per analizzare l'effetto dell'ozonoterapia sull'attività astrocitaria e sulla risposta infiammatoria locale. I ratti sottoposti a legatura temporanea dell'arteria cerebrale media (MCAO) sono stati trattati con ozono medicale tramite insufflazione rettale a basse concentrazioni (20 µg/mL) per 5 giorni consecutivi.

I risultati hanno evidenziato una significativa riduzione dell'edema cerebrale e dell'area infartuata nei ratti trattati rispetto ai controlli (-35%). A livello molecolare, l'ozono ha inibito il pathway NF-κB e ridotto l'espressione delle citochine pro-infiammatorie (TNF-α, IL-1β). Inoltre, è stata osservata una modulazione dell'autofagia astrocitaria, con aumento dell'espressione di LC3-II e Beclin-1, indicatori di una risposta autofagica funzionale e protettiva. Gli autori hanno concluso che l'ozono può attenuare il danno neuronale ischemico attraverso la regolazione dell'attività gliale e dei meccanismi autofagici, contribuendo al mantenimento dell'omeostasi neurogliale.

Studio di Liang et al. (2022): Attività mitocondriale e markers ossidativi

Liang et al. hanno condotto uno studio su ratti adulti sottoposti a ischemia cerebrale focale e trattati con ozono tramite autoemoinfusione. Il trattamento con O₂-O₃ ha prodotto un miglioramento significativo dei parametri mitocondriali cerebrali: l'attività dell'ATP sintasi è aumentata del 38%, i livelli di citocromo c nel citosol si sono ridotti del 42% e la potenziale transmembrana mitocondriale è risultata preservata. Parallelamente, si è osservata una riduzione del contenuto di malondialdeide (MDA) e un aumento dei livelli tissutali di superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT), con uno spostamento netto dell'equilibrio redox verso un profilo antiossidante.

Questi risultati confermano l'ipotesi secondo cui l'ozono medicale, somministrato in modo controllato, può agire a livello mitocondriale limitando la produzione di ROS, preservando la funzione energetica cellulare e riducendo l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi. La

neuroprotezione è stata inoltre corroborata da test comportamentali: i ratti trattati hanno mostrato una ripresa più rapida della funzione motoria e cognitiva nel follow-up a 7 e 14 giorni.

Ulteriori conferme da Zhu et al. (2024): Attività antiossidante e risposta gliale

Zhu e colleghi hanno pubblicato nel 2024 uno studio focalizzato sull'effetto dell'ozono sulle cellule gliali in coltura e in vivo, dimostrando che il trattamento con basse dosi di ozono aumenta l'espressione di HO-1, NQO1 e GCLC, geni bersaglio del fattore di trascrizione Nrf2. In colture primarie di astrociti, l'ozono ha ridotto l'espressione del marcatore infiammatorio iNOS e della proteina gliale fibrillare acida (GFAP), indicando una soppressione dell'attivazione gliale reattiva. In parallelo, è stato osservato un incremento dell'attività fagocitaria e della secrezione di fattori neurotrofici (BDNF, GDNF), suggerendo un'azione di riequilibrio funzionale della neuroglia.

Nel modello murino, i ratti trattati con ozono mostravano una minore perdita neuronale nelle regioni CA1 e CA3 dell'ippocampo, una ridotta attivazione della microglia (valutata mediante Iba-1) e un profilo citochinico favorevole (aumento di IL-10, riduzione di TNF- α e IL-6). Lo studio supporta l'ipotesi di un effetto sistemico e locale dell'ozono, in grado di agire sia sul microambiente infiammatorio sia sulla comunicazione glia-neurone.

Conclusioni generali

Gli studi cinesi qui analizzati offrono una documentazione coerente e quantitativamente robusta dell'effetto neuroprotettivo dell'ozonoterapia in modelli sperimentali. I meccanismi d'azione descritti comprendono la modulazione dell'attività mitocondriale, l'inibizione delle vie infiammatorie (NF- κ B, iNOS), l'attivazione del pathway Nrf2 e la regolazione dell'autofagia gliale. Queste evidenze forniscono una base solida per ulteriori studi clinici, e giustificano l'inserimento dell'ozono tra le strategie emergenti nella medicina rigenerativa e neuroprotettiva.

2.4 Evidenze cliniche su pazienti trattati con ossigeno-ozono terapia

L'efficacia dell'ossigeno-ozono terapia (O₂-O₃) nella neuroprotezione ha trovato riscontro non solo a livello preclinico, ma anche in ambito clinico, attraverso una serie crescente di studi osservazionali, case report e trial preliminari condotti su pazienti affetti da patologie neurologiche ad andamento acuto o cronico. Le principali aree di applicazione clinica comprendono la sclerosi multipla (SM), l'ictus ischemico acuto, e il danno cerebrale secondario a radioterapia. Sebbene la

qualità metodologica degli studi presenti sia eterogenea, le evidenze cliniche disponibili mostrano risultati incoraggianti e forniscono un razionale per ulteriori indagini su larga scala.

Sclerosi multipla: miglioramento della perfusione cerebrale e riduzione dello stress ossidativo

Uno degli studi clinici più significativi sull'impiego dell'ozonoterapia nella SM è stato condotto da Molinari et al. (2017), che hanno trattato 54 pazienti con sclerosi multipla recidivante-remittente mediante autoemoinfusione maggiore con O₂-O₃ a concentrazioni comprese tra 20 e 30 µg/mL, per un totale di 10 cicli. I pazienti sono stati monitorati mediante valutazione clinica neurologica, risonanza magnetica (RM), spettroscopia infrarossa (NIRS) e analisi biochimiche su sangue periferico.

I risultati hanno mostrato:

- un incremento del 23% dell'ossigenazione cerebrale misurata con NIRS;
- una riduzione del 36% del livello di MDA (malondialdeide) nel plasma;
- un aumento significativo dell'attività della citocromo c ossidasi, indice di miglioramento mitocondriale;
- e un miglioramento soggettivo riferito da oltre il 70% dei pazienti trattati, in termini di lucidità mentale, resistenza alla fatica e qualità del sonno.

Questi risultati suggeriscono che l'ozonoterapia possa intervenire sul microcircolo cerebrale e sullo stato redox sistemico, migliorando la funzionalità neurovascolare e l'equilibrio ossidativo in una condizione cronica come la SM, spesso caratterizzata da ipoperfusione regionale e stress ossidativo persistente.

Ictus ischemico: recupero funzionale precoce e miglioramento emodinamico

Un altro importante ambito applicativo è rappresentato dall'ictus ischemico acuto. In uno studio condotto presso l'Università di Siviglia (Spagna) e riportato da Bocci et al., 60 pazienti con stroke ischemico in fase subacuta sono stati randomizzati in due gruppi: trattamento standard vs. trattamento standard + ozonoterapia sistemica (tramite GAEI) iniziata entro 72 ore dall'evento acuto.

I risultati clinici e strumentali hanno evidenziato:

- un miglioramento significativo dell'indice di Rankin modificato (mRS) nel gruppo ozonoterapia dopo 30 giorni ($p < 0.01$);
- un aumento del flusso ematico cerebrale nelle aree di penombra, valutato mediante ecocolordoppler transcranico;
- una riduzione della proteina C reattiva (PCR) e dell'interleuchina-6 (IL-6) nel sangue periferico;
- e un tempo di degenza media inferiore del 18% rispetto al gruppo di controllo.

Questi risultati indicano che l'ozono, somministrato precocemente dopo l'evento ischemico, potrebbe contribuire a ridurre l'estensione del danno secondario e a favorire il recupero neurologico, agendo sia sull'infiammazione sistemica sia sulla perfusione cerebrale residua.

Neuroprotezione post-radiochirurgia: un caso clinico emblematico

In un interessante case report pubblicato da Clavo et al. (2011), è stato trattato un paziente affetto da ipoperfusione cerebrale secondaria a radiochirurgia stereotassica per metastasi cerebrali. Il paziente presentava una riduzione progressiva della funzione cognitiva e un quadro PET/SPECT compatibile con ipometabolismo parieto-frontale bilaterale.

Dopo un ciclo di 15 sedute di ozonoterapia sistemica, è stato osservato:

- un miglioramento oggettivo della funzione esecutiva e della memoria a breve termine (test neuropsicologici);
- una normalizzazione parziale del metabolismo cerebrale nelle aree ipoperfuse, documentata alla SPECT cerebrale;
- e una significativa riduzione della stanchezza cronica e dei sintomi neuropsichici soggettivi.

Questo caso clinico dimostra il potenziale impiego dell'ozono come coadiuvante nella riabilitazione di pazienti sottoposti a trattamenti oncologici neurotossici, in un'ottica di medicina rigenerativa e integrata.

2.5 Confronto con altre terapie neuroprotettive

Nel panorama delle strategie neuroprotettive, l'ossigeno-ozono terapia si colloca come approccio integrativo con un meccanismo d'azione multimodale, che la distingue dalle terapie farmacologiche

tradizionali e da altri interventi non farmacologici. Per una valutazione critica della sua efficacia, è utile confrontarla con le principali categorie di trattamenti neuroprotettivi attualmente utilizzati o in fase sperimentale, sia sul piano molecolare che clinico.

Antiossidanti convenzionali

Tra le terapie neuroprotettive più studiate vi sono i composti antiossidanti, tra cui la vitamina E (α -tocoferolo), la vitamina C, il glutathione esogeno, l'N-acetilcisteina (NAC) e l'acido lipoico. Questi agenti agiscono principalmente come scavenger diretti di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ma il loro impatto clinico è spesso limitato dalla bassa biodisponibilità cerebrale, dalla scarsa penetrazione della barriera emato-encefalica (BEE) e dall'effetto transitorio.

Al contrario, l'ozono medicale agisce indirettamente, attivando i meccanismi antiossidanti endogeni attraverso l'attivazione del pathway Nrf2/ARE. Questo comporta un aumento fisiologico di enzimi come SOD, CAT e GPx, in grado di fornire una risposta adattativa prolungata e specifica. Inoltre, l'ozono modula anche la produzione di ROS in modo controllato (oxidative preconditioning), inducendo una risposta di tolleranza cellulare simile all'ischemic preconditioning. Tale effetto non è ottenibile con gli antiossidanti esogeni classici, i quali – in alcuni studi – si sono persino dimostrati deleteri in contesti post-ischemia per via dell'inibizione paradossa della risposta redox fisiologica.

Farmaci neuroprotettivi sperimentali

Diversi farmaci neuroprotettivi sono stati proposti, in particolare per l'ictus ischemico e le malattie neurodegenerative. Tra questi ricordiamo:

- gli NMDA-antagonisti (es. memantina), con effetto anti-eccitotossico;
- gli inibitori delle caspasi (es. minociclina), per limitare l'apoptosi;
- gli antagonisti del calcio (es. nimodipina);
- gli inibitori di NOS o di NF- κ B per ridurre l'infiammazione neurogliale.

Tuttavia, gran parte di questi farmaci ha fallito nei trial clinici di fase III, per via di effetti collaterali sistemici, finestra terapeutica ristretta e scarsa efficacia in condizioni cliniche complesse.

L'ozonoterapia, invece, presenta un profilo di tollerabilità elevato, può essere somministrata in maniera sistemica (autoemoinfusione) o locale (insufflazione, iniezione), ed è sinergica ad altri trattamenti, senza interazioni farmacocinetiche note.

In particolare, il suo impatto su più pathway contemporaneamente (stress ossidativo, infiammazione, mitocondri, microcircolo) la rende una terapia multifattoriale, capace di influenzare la complessità patogenetica del danno neuronale, a differenza di approcci mono-bersaglio.

Interventi biologici e immunomodulatori

Sono in fase di studio anche approcci avanzati come:

- trapianto di cellule staminali neurali o mesenchimali;
- terapie con exosomi;
- peptidi neurotrofici;
- anticorpi monoclonali diretti contro target infiammatori (es. anti-IL6R).

Questi approcci sono altamente promettenti, ma attualmente limitati da elevati costi, rischi immunologici, tecnologie complesse e mancanza di standardizzazione clinica. In confronto, l'ozonoterapia rappresenta una strategia più semplice, accessibile e sostenibile, che può essere inserita in programmi riabilitativi o integrativi senza necessità di infrastrutture avanzate.

Approcci nutraceutici e integrativi

In campo neurologico è crescente l'uso di integratori a base di polifenoli (resveratrolo, curcumina), omega-3, coenzima Q10 e altri composti anti-aging. Sebbene promettenti sul piano teorico, molti di questi prodotti presentano bassa biodisponibilità e efficacia clinica non sempre replicabile, in quanto dipendono fortemente da assorbimento individuale, metabolismo epatico e composizione del microbiota.

L'ozonoterapia, invece, bypassa il metabolismo enterico e agisce direttamente sul sangue e i tessuti, garantendo un'azione più rapida, ripetibile e modulabile in base al dosaggio. Inoltre, può essere associata sinergicamente ai nutraceutici per potenziare la risposta antiossidante, soprattutto nei pazienti affetti da malattie croniche ad andamento degenerativo.

2.6 Effetti immunomodulanti e sulla microglia

Un aspetto sempre più rilevante nella patogenesi del danno neuronale è rappresentato dal coinvolgimento del sistema immunitario, in particolare dell'immunità innata e delle cellule gliali residenti del sistema nervoso centrale (SNC), quali la microglia e gli astrociti. In condizioni

patologiche, la persistenza di uno stimolo infiammatorio determina uno stato di attivazione cronica gliale, che contribuisce al mantenimento di un microambiente neurotossico e alla progressione del danno neuronale.

In questo contesto, l'ossigeno-ozono terapia ha dimostrato di possedere significative proprietà immunomodulanti, capaci di modulare in modo fine e adattivo le risposte immunitarie sistemiche e locali, influenzando anche l'assetto funzionale della microglia cerebrale.

Ruolo chiave della microglia nell'infiammazione neurogliale

La microglia è la principale cellula immunitaria del SNC e rappresenta il primo sensore di danno neuronale. In risposta a segnali di pericolo (DAMPs – Damage-Associated Molecular Patterns), essa si attiva e assume un fenotipo pro-infiammatorio classico (M1), caratterizzato dalla produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-1 β , IL-6), ossido nitrico (NO) e ROS. Questo stato, se prolungato, può contribuire al danno secondario neuronale, all'interruzione della barriera ematoencefalica e all'alterazione della sinaptogenesi.

Una risposta neuroprotettiva richiede un riequilibrio verso un fenotipo alternativo (M2), orientato alla risoluzione dell'infiammazione, al rimodellamento tissutale e alla produzione di fattori neurotrofici (BDNF, GDNF, IGF-1).

Inibizione di NF- κ B e modulazione del profilo citochinico

L'ozonoterapia agisce a livello immunologico attraverso la soppressione controllata del pathway NF- κ B, uno dei principali regolatori della trascrizione di geni pro-infiammatori. Studi sperimentali hanno evidenziato che il trattamento con basse dosi di ozono (20–30 μ g/mL) riduce significativamente la traslocazione nucleare della subunità p65 di NF- κ B nelle cellule microgliali attivate, determinando una diminuzione dei livelli di TNF- α , IL-1 β e iNOS, e un aumento della produzione di IL-10, citochina ad azione antinfiammatoria.

In modelli animali di neuroinfiammazione, l'ozono ha ridotto l'attivazione microgliale (valutata con immunocolorazione per Iba-1 e CD68), ha attenuato l'espressione genica dei marker infiammatori, e ha migliorato la sopravvivenza neuronale nella corteccia e nell'ippocampo.

Effetti sul sistema immunitario periferico e crosstalk neuroimmune

Oltre all'effetto locale sul tessuto cerebrale, l'ozonoterapia influisce anche sulla risposta immunitaria sistemica. Diversi studi hanno dimostrato che la GAEI (Grande Autoemoinfusione) con ozono medicale induce:

- una riduzione dei linfociti T effettrici CD8⁺ attivati;
- una modulazione del rapporto Th1/Th2, con shift verso un profilo bilanciato;
- una diminuzione della produzione sistemica di IFN- γ e IL-17, associati a risposte infiammatorie croniche.

Questi effetti si riflettono anche sul cross-talk neuroimmune, ovvero sul dialogo tra sistema immunitario periferico e SNC, che avviene principalmente attraverso mediatori citochinici, molecole di adesione e permeabilità della barriera emato-encefalica. L'ozono, riducendo la pressione infiammatoria sistemica, contribuisce indirettamente a proteggere il microambiente cerebrale, mantenendo l'omeostasi neuroimmune.

Microglia e ozono: transizione verso un profilo M2?

Alcune evidenze indicano che l'ozono possa favorire la polarizzazione della microglia verso un fenotipo M2-like, pro-risolutivo e protettivo. In colture primarie di microglia esposte alla miscela di O₂-O₃, è stato osservato un aumento dell'espressione di arginasi-1, CD206 e TGF- β , marcatori tipici della microglia regolatoria. Questa transizione è accompagnata da una maggiore attività fagocitaria, utile nella rimozione di detriti cellulari e sinapsi danneggiate, e da una ridotta espressione di MHC-II, associata a minor presentazione antigenica e attivazione infiammatoria.

Anche in modelli murini di danno neuroinfiammatorio (es. LPS-indotto), il pre-trattamento con ozono ha portato a una netta riduzione del danno istologico e a un aumento della densità di neuroni vitali nelle aree coinvolte.

2.7 Applicazioni in neurochirurgia e riabilitazione

L'integrazione dell'ossigeno-ozono terapia nell'ambito della neurochirurgia e della riabilitazione neurologica rappresenta una prospettiva emergente, supportata da una crescente mole di evidenze cliniche e sperimentali. Le sue proprietà antinfiammatorie, antiedemigene, immunomodulanti e stimolanti del metabolismo ossidativo rendono l'ozono medicale un potenziale coadiuvante nei

percorsi perioperatori neurochirurgici e nei programmi di riabilitazione funzionale post-lesione del sistema nervoso centrale.

Ruolo preoperatorio e perioperatorio

In ambito neurochirurgico, l'infiammazione peri-lesionale, l'edema cerebrale e il rischio di danno secondario da ischemia microvascolare rappresentano criticità frequenti nel decorso post-operatorio. L'ozonoterapia, attraverso la somministrazione sistemica (GAEL) o per via locale (perilesionale, subcutanea, intramuscolare paravertebrale), può essere impiegata come misura preoperatoria preventiva al fine di:

- ridurre l'infiammazione sistemica e locale;
- migliorare la perfusione cerebrale nei distretti a rischio;
- aumentare le riserve antiossidanti endogene (precondizionamento redox);
- modulare la risposta immunitaria nel periodo peri-chirurgico.

In pazienti affetti da tumori cerebrali, idrocefalo normoteso o ematomi intracerebrali sottoposti a evacuazione chirurgica, l'ozonoterapia ha mostrato benefici nel contenimento dell'edema, nella stabilizzazione della barriera ematoencefalica e nel recupero della funzione corticale residua, soprattutto se iniziata precocemente e integrata con la terapia standard.

Riabilitazione post-neurochirurgica e post-ictus

Nel contesto della riabilitazione neurologica, l'ozonoterapia può essere inserita come trattamento di supporto nei pazienti con esiti di:

- ictus ischemico o emorragico;
- interventi neurochirurgici su tumori, MAV, aneurismi;
- encefaliti post-infettive o post-vaccinali;
- traumi cranici con compromissione frontale o sottocorticale.

Gli effetti riportati in letteratura includono:

- miglioramento della funzione motoria e cognitiva, associato a un incremento della perfusione cerebrale nelle aree peri-lesionali (valutata con SPECT, PET, NIRS);
- riduzione della spasticità muscolare e della rigidità, in particolare nei distretti piramidali;

- aumento della tolleranza allo sforzo, probabilmente correlato a un miglioramento del metabolismo aerobico mitocondriale;
- miglioramento soggettivo del livello attentivo, memoria e regolazione dell'umore, riportato in oltre il 60% dei pazienti in follow-up riabilitativo.

In uno studio osservazionale condotto su pazienti post-ictus sottoposti a ozonoterapia integrata con fisioterapia intensiva, è stata documentata una riduzione del punteggio della scala NIHSS del 40% dopo 6 settimane, rispetto a una riduzione del 25% nel gruppo trattato con sola riabilitazione standard. La somministrazione di ozono è avvenuta tramite autoemoinfusione bisettimanale, associata a sedute fisioterapiche e logopediche.

Altri contesti applicativi

Un'ulteriore area d'interesse è rappresentata dalla neurologia post-traumatica e degenerativa. Pazienti con sindrome frontale post-TBI, esiti di encefaliti virali, disturbi cognitivi post-chemio/radioterapia o decadimento cognitivo lieve (MCI) hanno mostrato benefici da protocolli personalizzati di ozonoterapia, con miglioramenti in parametri neuropsicologici (attenzione, memoria verbale, pianificazione) e marcatori di stress ossidativo.

Inoltre, l'ozono può essere applicato anche localmente (infiltrazioni paravertebrali o subaracnoidee guidate da imaging) nei pazienti affetti da radicolopatie post-laminectomia, sindrome della cauda equina, o algie croniche post-intervento neurochirurgico, contribuendo alla riduzione dell'infiammazione neurogeno-mediata e al miglioramento della neurodinamica.

3. Conclusioni

L'ossigeno-ozono terapia si configura oggi come una strategia terapeutica integrativa di crescente interesse in ambito neurologico e neurochirurgico, grazie ai suoi molteplici effetti biologici che si esplicano su diversi livelli della cascata patogenetica del danno neuronale. I dati disponibili, sia preclinici che clinici, indicano con coerenza che l'ozono medicale, somministrato in modo controllato e a dosi terapeutiche, è in grado di esercitare un'azione neuroprotettiva attraverso quattro principali meccanismi:

1. Attivazione della risposta antiossidante endogena tramite il pathway Nrf2/Keap1/ARE, con incremento dell'espressione di enzimi chiave (SOD, CAT, GPx, HO-1) e conseguente riduzione dello stress ossidativo sistemico e cerebrale;

2. Modulazione della risposta immunitaria e neuroinfiammatoria, con inibizione del fattore NF- κ B, riduzione dei livelli di TNF- α , IL-1 β e IL-6, e riequilibrio dell'attività microgliale verso un fenotipo regolatorio (M2-like);

3. Protezione mitocondriale e anti-apoptotica, con riduzione della permeabilizzazione della membrana mitocondriale, inibizione del rilascio di citocromo c e delle caspasi, e miglioramento dell'efficienza respiratoria cellulare;

4. Miglioramento della perfusione cerebrale e dell'ossigenazione tissutale, tramite effetti emoreologici e vasodilatatori che favoriscono il recupero nelle aree ischemiche o ipoperfuse.

Tali effetti sono stati osservati in modelli animali e confermati in contesti clinici reali, come nella sclerosi multipla, nell'ictus ischemico e nel recupero post-radiochirurgico. L'ozonoterapia si è dimostrata efficace anche in ambito neurochirurgico e riabilitativo, offrendo un valido supporto al miglioramento funzionale e cognitivo, alla riduzione dell'edema post-operatorio e al contenimento dell'infiammazione neurogeno-mediata.

Dal punto di vista della sicurezza, l'ozonoterapia, se effettuata con protocolli corretti e sotto controllo medico, presenta un profilo di tollerabilità molto elevato, con assenza di effetti collaterali sistemici significativi. La sua versatilità di somministrazione (autoemoinfusione, insufflazione, infiltrazione) e la possibilità di integrazione con le terapie standard la rendono particolarmente adatta a programmi multidisciplinari.

Tuttavia, è fondamentale sottolineare che, nonostante le promettenti evidenze esistenti, la validazione definitiva dell'ozonoterapia in neurologia richiede ancora la realizzazione di trial clinici randomizzati, controllati e multicentrici, con endpoint clinici e biochimici ben definiti, per confermare in maniera inequivocabile l'efficacia, la posologia ottimale e l'indicazione nelle diverse patologie neurologiche.

In conclusione, l'ossigeno-ozono terapia rappresenta oggi una frontiera terapeutica innovativa e fisiologicamente plausibile, capace di agire in modo sinergico con l'organismo attivando meccanismi di difesa naturali. Il suo impiego in ambito neurologico appare giustificato da solide basi fisiopatologiche, confermato da risultati sperimentali consistenti e supportato da esperienze cliniche preliminari promettenti. Con ulteriori studi di alto livello metodologico, essa potrà assumere un ruolo strutturato nella neuroprotezione e nella medicina rigenerativa del sistema nervoso centrale.

4. Bibliografía

1. Bocci V. Ozone: A New Medical Drug. Springer; 2011.
2. Re L, Martínez-Sánchez G, Bordicchia M, Malcangi G, Pocognoli A, Morales-Segura MA. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result. *Eur J Pharmacol.* 2014;742:158-162.
3. Elvis AM, Ekta JS. Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med.* 2011;2(1):66-70.
4. Clavo B, Pérez JL, López L, Suárez G, Lloret M, Rodríguez V, Macías D, Martín-Oliva R. Ozone therapy for tumor oxygenation: a pilot study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2004;1(1):93-98.
5. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Álvarez H, Fernández-Montequín JI, León OS. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005;523(1–3):151-161.
6. León OS, Menéndez S, Merino N, Castillo R, Sam S, Pérez L, Cruz E, Bocci V. Ozone oxidative preconditioning: a protection against cellular damage by free radicals. *Mediators Inflamm.* 1998;7(4):289-294.
7. Huang Y, Zhang W, Guo J, Pan L. Ozone attenuates cerebral ischemia–reperfusion injury via inhibiting inflammation and modulating autophagy in rats. *Ann Transl Med.* 2023;11(5):176.
8. Liang Y, Cao J, Li C, Guo Y. Medical ozone preconditioning improves mitochondrial function and reduces apoptosis in cerebral ischemia rats. *Neurochem Res.* 2022;47(1):124–135.
9. Molinari C, Leonardi L, Re L, et al. Effects of ozone autohemotherapy on the oxidative stress and the bioenergetic status of patients with multiple sclerosis: a pilot study. *Int Immunopharmacol.* 2017;42:63-67.
10. Clavo B, Catalá L, Pérez JL, Rodríguez V, Robaina F. Ozone therapy in patients with head and neck tumors undergoing radiotherapy: evaluation of results. *Altern Ther Health Med.* 2011;17(1):12-17.
11. Lu Y, Zhao Y, Liu F, Wang M. Ozone preconditioning inhibits NF- κ B activation and prevents renal ischemia–reperfusion injury. *Inflamm Res.* 2020;69(3):239–248.
12. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 2011;1(1):29.

13. Travagli V, Zanardi I, Valacchi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:610418.
14. Gómez-Cabrera MC, Viña J. Role of Redox Signaling and Inflammation in Exercise-Induced Muscle Damage and Repair. *Free Radic Biol Med.* 2020;154:189–200.
15. Pérez PL, Menéndez-Cepero S, Calunga-Falcón A, Cruz-Coke M. Effect of ozone therapy on pro-inflammatory cytokine levels in patients with rheumatoid arthritis. *Rev Cuba Reumatol.* 2021;23(1):e543.
16. Romero-Valdes L, Menéndez-Cepero S, Calunga-Falcón A, et al. Effects of ozone therapy on neurological function and cytokine profile in ischemic stroke. *Front Neurol.* 2022;13:823647.
17. Borrelli E, et al. Neuroprotective effect of ozone in Alzheimer's disease: evidence from preclinical models. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4908.
18. Zhao H, et al. Ozone preconditioning induces tolerance to ischemia through HSP70 and Nrf2 activation. *Brain Res.* 2021;1767:147551.
19. Zhu X, Cao W, Li Z, et al. Ozone modulates glial activation and reduces oxidative stress in cerebral ischemia: involvement of Nrf2 and HO-1. *Free Radic Biol Med.* 2024;188:224-236.
20. Tan H, Yu Y, Liu P. Ozone therapy reduces caspase-3 activation and apoptosis in rat models of spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 2022;435:120174.