



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica

Master di II° Livello in Ossigeno Ozono Terapia

(Coordinatore: Chiar.mo Prof. Plinio Richelmi)

**“L'UTILIZZO DELL'OSSIGENO-OZONO  
TERAPIA PER IL CONTROLLO DEL DOLORE  
NEGLI ANIMALI DA COMPAGNIA: STORIE DI  
SUCCESSI TERAPEUTICI”**

RELATORE :

Prof.ssa Frosi Alessandra Maria

TESI di

Dott.ssa Carrella Carmela

Matr. 487904

Anno Accademico 2019-2020

# **INDICE**

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1

L'OSSIGENO-OZONO TERAPIA IN MEDICINA VETERINARIA

- MECCANISMO D'AZIONE
- PRINCIPALI IMPIEGHI E VIE DI SOMMINISTRAZIONE NEI PET

CAPITOLO 2

MECCANISMI DI CONTROLLO DEL DOLORE MEDIANTE OZONO

- IL DOLORE
- FISIOPATOLOGIA DEL DOLORE
- AZIONE ANTALGICA DELL'OZONO

CAPITOLO 3

ANALISI DELLE ESPERIENZE RIPORTATE IN LETTERATURA

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

## INTRODUZIONE

L'utilizzo dell'Ozono-Ossigeno terapia sta diventando sempre più frequente in Medicina Veterinaria, specialmente nella pratica clinica degli animali da compagnia. L'Ozono viene impiegato in un gran numero di patologie di natura infiammatoria, infettiva e degenerativa, con un'elevata percentuale di successi.

L'Ozono è una molecola fortemente ossidante, che per azione paradossa stimola il sistema antiossidante endogeno. Questo si traduce in molteplici effetti benefici: attività antimicrobica, antinfiammatoria e antalgica, immunomodulante e di stimolazione del microcircolo.

In questo lavoro viene descritto il meccanismo di azione dell'Ozono, con particolare riferimento al suo effetto antalgico. L'azione antalgica dell'Ozono è multifattoriale. L'Ozono agisce modulando la sintesi delle sostanze algogene, riducendo l'azione dei mediatori chimici dell'infiammazione a favore di quelli con attività antinfiammatoria e potenziando i meccanismi endogeni del controllo del dolore.

Si riportano i principali lavori sul controllo del dolore mediante Ozono, pubblicati su riviste nazionali ed internazionali degli ultimi 20 anni. La maggior parte dei lavori descritti in letteratura riguarda le patologie osteo-articolari, in particolare ernie/protrusioni discali e osteo-artrosi nella specie canina, che sono tra le principali cause di consulto Medico Veterinario per il dolore e le disfunzioni meccaniche che ne conseguono. Viene riportato

anche uno studio relativo all'utilizzo dell'Ozono per il controllo del dolore post operatorio.

La totalità degli autori è concorde nell'affermare che l'Ossigeno-Ozono terapia sia una valida alternativa alle tradizionali terapie farmacologiche o chirurgiche e che sia una pratica medica efficace, non invasiva e priva di effetti collaterali, se correttamente eseguita.

## **CAPITOLO 1**

### **L' OSSIGENO-OZONO TERAPIA IN MEDICINA VETERINARIA**

L'Ossigeno-Ozono terapia è una pratica medica utilizzata con successo nella cura di un gran numero di patologie, il cui principio attivo è l'Ozono medicale: una miscela di Ossigeno – Ozono, in cui l'Ozono è presente in concentrazioni terapeutiche variabili.

Nonostante sia una molecola fortemente ossidante, l'utilizzo dell'Ozono a dosi terapeutiche non risulta nocivo. Anzi, genera uno stress ossidativo controllato e transitorio, che per azione paradossa attiva i sistemi antiossidanti endogeni<sup>[51]</sup>. L'Ozono viene utilizzato per le sue spiccate proprietà antibatteriche, antivirali e antifungine, antinfiammatorie, antidolorifiche e immunomodulanti.

La terapia con Ozono, se il trattamento è correttamente praticato, è priva di effetti collaterali rilevanti. Gli unici pazienti che non si possono sottoporre ad Ozonoterapia sono gli ipertiroidei e quelli affetti da deficit di glucosio-6-fosfatodeidrogenasi (favismo). Non va inalato, perché risulta irritante per le mucose respiratorie. Non provoca reazioni allergiche di alcun tipo, in quanto non è una molecola proteica.

L'Ozonoterapia è un trattamento poco invasivo, di facile utilizzo e dai costi contenuti.

L'Ossigeno–Ozono terapia in Medicina Veterinaria è utilizzata da circa 30 anni. A partire dagli anni 2000 sono stati pubblicati diversi lavori in letteratura internazionale, che dimostrano appunto l'utilizzo dell'Ozono in svariati campi applicativi della Medicina Veterinaria<sup>[42]</sup>: dalla zootecnia all'igiene e conservazione degli alimenti. Purtroppo, studi clinici sull'utilizzo dell'Ozono nei piccoli animali sono ancora in numero limitato, essendo un approccio terapeutico nuovo e ancora in fase di standardizzazione.

### ***MECCANISMO D'AZIONE***

L'Ozono è una forma allotropica dell'Ossigeno (O<sub>3</sub>). È una molecola fortemente ossidante e altamente instabile: a 20°C ha un tempo di dimezzamento di 40 minuti, in soluzione acquosa di soli 20 minuti. Questa è la ragione per cui deve essere somministrato subito dopo la sua preparazione. L'Ozono si scompone in O<sub>2</sub> e anione superossido O<sub>2</sub><sup>-</sup> un radicale libero altamente reattivo.

Nei liquidi biologici, quali plasma, liquido sinoviale, liquido interstiziale, l'Ozono si dissolve rapidamente nella componente acquosa e reagisce immediatamente con gli acidi grassi insaturi (PUFA) e i composti riducenti, tra i quali il glutathione ridotto (GSH) riveste un ruolo principale. Tali reazioni portano alla formazione di lipoperossidi (LOP) e specie reattive dell'ossigeno (ROS), responsabili dell'effetto terapeutico dell'Ozono<sup>[1, 5, 50]</sup>. Questi prodotti generano un transitorio e lieve stress ossidativo<sup>[51]</sup>, che tuttavia non risulta nocivo, perché neutralizzato dai sistemi antiossidanti

endogeni presenti in tutti i tessuti. La quantità di antiossidanti è diversa tra un tessuto e l'altro e ciò giustifica la diversa quantità di Ozono da utilizzare nelle varie vie di somministrazione e nelle varie patologie.

I ROS comprendono numerosi radicali liberi. Oltre all'anione superossido si conoscono ossido nitrico (NO), perossinitrito ( $\text{NO}_3^-$ ), perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e acido ipocloroso (HClO). Una volta prodotti, i ROS hanno un'emivita brevissima, pari a una frazione di secondo, perché vengono neutralizzati dai sistemi antiossidanti endogeni. Tra tutti i ROS, il più importante è il perossido di idrogeno, che diffonde rapidamente all'interno degli eritrociti, dei leucociti e delle piastrine, attivando numerose vie biochimiche. L'utilizzo dell'Ozono a dosi terapeutiche determina quindi un aumento di perossido di idrogeno all'interno delle cellule, che tuttavia non risulta tossico, anzi funge da messaggero chimico<sup>[5]</sup>.

I composti derivati dalla degradazione dei PUFA, sono stati denominati da Pryor con l'acronimo LOPs, cioè lipid oxidation product<sup>[38]</sup>. Sono un gruppo eterogeneo di molecole, rappresentati da una varietà di aldeidi e alchenali. I LOPs hanno un'emivita più lunga e ricoprono il ruolo di potenziali messaggeri ai distretti periferici (endotelio, midollo osseo e altri organi)<sup>[35]</sup>. In particolare il 4-HNE (4-idrossinonenale) è considerato un elemento chiave nella trasduzione del segnale cellulare. Ha un'azione cito protettiva a secondo della quantità: a concentrazioni di 0,1-5 micromoli promuove l'attivazione dei sistemi antiossidanti endogeni; a concentrazioni maggiori, invece, risulta tossico<sup>[13]</sup>.

La presenza di ROS e LOPs induce quindi l'attivazione dei sistemi antiossidanti endogeni:

- superossidodismutasi SOD: elimina lo ione superossido mediante una reazione di dismutazione che lo trasforma in perossido di idrogeno
- catalasi: enzima chiave nella conversione del perossido di idrogeno in acqua e O<sub>2</sub>
- glutazione perossidasi Gpx: molecola scavenger nei confronti dei radicali liberi dell'O<sub>2</sub>.

Il meccanismo alla base dell'azione antiossidante è l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare eritroide 2 Nrf2 [13, 20, 40], che modula la produzione degli enzimi cito protettivi antiossidanti. Nrf2 è normalmente presente nel citoplasma, in forma inattiva, legato alla proteina Keap 1. In caso di aumento dello stress ossidativo, Nrf2 si dissocia da Keap 1 e trasloca nel nucleo. Qui si lega alla sequenza nucleotidica ARE (antioxidant-responsive elements) e induce la trascrizione di geni che codificano diversi enzimi antiossidanti, tra cui: SOD, catalasi, Gpx, GSH sintetasi, Glutazione-S-Transferasi (GST), glutammato-cisteina ligasi (GCL), NADPH chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1), eme-ossigenasi (HO-1). Quest'ultimo aumenta considerevolmente dopo ozonizzazione del sangue<sup>[2]</sup>. HO-1 è un enzima essenziale nel catabolismo dell'eme, ma presenta anche spiccate proprietà citoprotettive<sup>[29]</sup>, perché incrementa l'attività degli enzimi antiossidanti, e antinfiammatorie, perché stimola la produzione di citochine antinfiammatorie (IL 10)<sup>[27]</sup>

L'attivazione di Nrf2 è in grado di modulare una moltitudine di funzioni biologiche. Sono stati descritti infatti più di 200 geni ARE, che codificano per proteine coinvolte non solo nella risposta allo stress ossidativo, ma anche nell'omeostasi proteica, riparazione del DNA, proliferazione, autofagia, funzione mitocondriale, metabolismo dei lipidi, carboidrati e aminoacidi e nell'infiammazione. Nrf2 modula l'infiammazione attraverso molteplici meccanismi, tra cui la soppressione dei geni pro-infiammatori, sia direttamente che attraverso l'interazione con un altro fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B.<sup>[20]</sup> L'azione diretta si basa sul mancato reclutamento della RNA polimerasi II per avviare la trascrizione genica delle citochine pro infiammatorie IL1 $\beta$  e IL-6. Inoltre Nrf2 inibisce l'attività del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, responsabile della regolazione delle risposte infiammatorie, attraverso l'espressione di geni che codificano citochine e chemochine pro infiammatorie e attraverso l'attivazione e la differenziazione delle cellule immunitarie innate (macrofagi) e delle cellule T infiammatorie (Th1). L'Ozono esplica quindi la sua azione antinfiammatoria, bloccando il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B.

L'Ozono, a differenza dei farmaci tradizionali, che agiscono con un meccanismo recettoriale, si comporta come un pro-farmaco ormetico<sup>[8]</sup>: induce cioè una risposta antiossidante adattativa, dose dipendente.

Il range terapeutico in Medicina Veterinaria oscilla tra 10 e 50  $\mu$ g/ml. Al di sotto di 10  $\mu$ g/ml non si evidenzia alcun effetto terapeutico. Al di sopra di 60-70 $\mu$ g/ml si eccede la capacità antiossidante endogena e si possono avere effetti collaterali anche gravi, come necrosi tissutale.

Dosi medio-basse di Ozono sono utilizzate per ottenere un effetto antinfiammatorio, antalgico e immunomodulante. Dosi elevate hanno effetto antisettico e immunosoppressore e sono utilizzate per la preparazione di acqua e olio ozonizzati.

Nelle varie specie animali la tolleranza alla concentrazione di Ozono è variabile. Ad esempio, i felini tollerano meno lo stress ossidativo ozono indotto, rispetto alla specie canina. Per tanto nei felini si utilizzano dosi più basse.

La concentrazione di Ozono va adattata anche in base alla taglia dell'animale, che nella specie canina, ad esempio, è estremamente variabile: dai 2/3 kg delle razze toy, fino agli 80 kg delle razze giganti. In Spagna sono in corso studi che mettono in relazione la dose con il peso corporeo.

L'Ozono trova impiego in medicina principalmente per la sua azione:

- Antivirale, antibatterica e antimicotica
- Antinfiammatoria – antalgica
- Immunomodulante
- Stimolante del microcircolo.

L'**azione antimicrobica** dell'Ozono si esplica mediante ossidazione delle lipoproteine, che costituiscono le membrane cellulari microbiche, ad opera dei perossidi, con un meccanismo di azione simile a quello che l'organismo utilizza abitualmente: i leucociti, infatti, producono una sostanza antiossidante simile all'Ozono, che provoca la lisi delle lipoproteine<sup>[53]</sup>.

L'**azione antinfiammatoria e antalgica** è espletata in diversi modi: modulando la sintesi delle prostaglandine, riducendo l'azione dei mediatori chimici dell'infiammazione a favore di quelli con attività antinfiammatoria e potenziando i meccanismi endogeni del controllo del dolore.

L'**azione immunomodulante** dell'Ozono si esplica a carico dei linfociti e dei monociti<sup>[26]</sup>. Diversi studi hanno dimostrato che l'Ozono modula il rilascio di citochine, quali interferone  $\beta$  e  $\gamma$ , fattore di necrosi tumorale TNF- $\alpha$  e interleuchine 2, 6, 8<sup>[4, 36]</sup> con conseguente incremento della leucocitosi e della fagocitosi. L'azione dell'Ozono sul sistema immunitario è dose dipendente: un dosaggio basso ha effetti stimolanti sul sistema immunitario; un dosaggio elevato, invece, ha effetti inibitori sul sistema immunitario.

L'effetto positivo dell'Ozono sul **microcircolo** è legato all'azione diretta sui globuli rossi e sulle piastrine. Nei globuli rossi l'Ozono accelera la glicolisi, aumenta la produzione di 2-3 difosfoglicerato, responsabile della cessione di ossigeno ai tessuti, aumenta la deformabilità e riduce la tendenza all'impilamento, mediante una lipo-perossidazione controllata della membrana eritrocitaria<sup>[1]</sup>. A carico delle piastrine si ha un aumento nel rilascio di ATP e di fattori di crescita, che stimolano la rigenerazione cellulare e inducono il rilasciamento della muscolatura liscia vascolare. Come conseguenza si ha una migliore perfusione e ossigenazione tissutale. Inoltre l'Ozono essendo idrofobo, favorisce l'eliminazione dell'edema che accompagna gli stati infiammatori.

In generale l'Ozonoterapia, apportando una maggiore quantità di ossigeno all'organismo, influenza positivamente il metabolismo glucidico, lipidico e protidico. Dopo l'ozonizzazione del sangue si ha un incremento della glicolisi e un migliore utilizzo del glucosio da parte delle cellule, che ha come conseguenza la riduzione della glicemia. Viene stimolato il catabolismo dei grassi mediante lipolisi diretta e sierologicamente si riscontra riduzione del colesterolo e dei trigliceridi. L'intervento dell'Ozono nel metabolismo protidico è dovuto alla sua affinità per i gruppi sulfidrilici: reagisce con aminoacidi essenziali (metionina e triptofano) o contenenti zolfo (cisteina) la cui degradazione risulta tuttavia protetta dall'ossidazione del glutatone e dei coenzimi NADH e NADPH.

### ***PRINCIPALI IMPIEGHI E VIE DI SOMMINISTRAZIONE NEI PET***

Analogamente alla Medicina umana, anche in Medicina Veterinaria si è cominciato ad utilizzare l'Ozono principalmente per le patologie discali (ernie o protrusioni). Essendo una terapia estremamente versatile trova impiego anche per altre patologie. Attualmente, nella pratica clinica degli animali da compagnia, l'Ozonoterapia viene utilizzata con successo in numerose affezioni: cutanee, muscolo scheletriche, urogenitali e gastroenteriche di varia natura. Ne sono un esempio:

- Ulcere cutanee
  
- Piaghe da decubito
  
- Granulomi da leccamento

- Ustioni
  
- Ferite e fistole
  
- Dermatiti e dermatosi di varia origine
  
- Otiti esterne
  
- Ascessi
  
- Artrite
  
- Artrosi
  
- Ernie discali
  
- Cistiti
  
- Vulvo – vaginiti
  
- Enteriti e gastriti
  
- Epatiti

A secondo della patologia che si desidera trattare e dell'effetto che si vuole ottenere, l'Ozono può essere somministrato in varie modalità sia per via sistemica, sia localmente. Tuttavia rispetto alla Medicina umana, in Medicina Veterinaria la scelta della via di somministrazione è influenzata dalla natura dei pazienti: alcuni animali mostrano scarsa tolleranza alla manipolazione e al contenimento, per tanto per alcune procedure andrebbero sedati. Nella pratica, quindi, si utilizzano le vie di accesso meno invasive e maggiormente tollerate, quali l'insufflazione rettale, le infiltrazioni

sottocutanee, para-vertebrali o intra-articolari, la somministrazione endovesicale e la via topica.

### **Insufflazione rettale**

È la via di somministrazione maggiormente usata in Medicina Veterinaria e sostituisce la GAEI, per la ricca vascolarizzazione della mucosa rettale, che permette un efficace assorbimento del principio attivo<sup>[6]</sup>. Va sottolineato però che, in termini di dosaggio, è meno precisa rispetto alla GAEI, perché anche un modesto residuo di feci può assorbire una parte di Ozono.

Dopo l'insufflazione, l'Ozono si solubilizza nell'acqua luminale e reagisce con i componenti del film mucoproteico sovrastante la mucosa. La reazione è istantanea e determina la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e dei LOPs assorbiti immediatamente dalla mucosa. È stato dimostrato che dopo soli 15-20 minuti dall'insufflazione si ha un aumento della PO<sub>2</sub> nel sangue portale e dopo circa 35 minuti nel sangue venoso giugulare. Permane un aumento dei LOPs nel sangue fino a 60 minuti dopo l'insufflazione<sup>[7]</sup>. A livello locale l'Ozono agisce anche sul tessuto linfoide intestinale (GALT), stimolando in particolare i linfociti T, con un'azione antinfiammatoria e immunosoppressiva locale.

Le indicazioni terapeutiche sono molteplici: patologie epatiche acute e croniche, patologie gastro intestinali di natura autoimmune, allergica, batterica o virale, patologie autoimmuni sistemiche, allergie, dermatiti, trattamento del dolore, trattamento complementare in oncologia e patologie oculari.

### **Infiltrazione sottocutanea**

Trova applicazione in tutte le patologie cutanee: ulcere, dermatiti croniche<sup>[24]</sup> di natura batterica, fungina e immunomediata, nelle vasculiti, negli ematomi, piaghe da decubito e nelle ferite con perdita di sostanza.

L'iniezione può essere intralesionale o perilesionale. L'effetto benefico è dovuto all'azione antinfiammatoria, disinfettante e battericida locale.

Inoltre, il miglioramento del microcircolo aumenta il trofismo cellulare e stimola la riparazione tissutale<sup>[46]</sup>.

### **Infiltrazione para-vertebrale**

Si tratta di una iniezione intramuscolare, da effettuarsi a 1-2 cm dallo spazio intervertebrale, lateralmente alla sede di lesione. L'Ozono iniettato nel muscolo, si dissolve nell'interstizio, dando luogo alla formazione in loco di ROS e LOP.

L'infiltrazione para-vertebrale trova applicazione principalmente nelle protrusioni/estrusioni discali e nella spondiloartrosi. L'Ozono agisce simultaneamente sulla parte degenerata del disco, provocandone la lisi, riduce l'infiammazione e il dolore locale e, grazie al miglioramento della perfusione, riduce l'ischemia e la compressione radicolare<sup>[9]</sup>.

### **Infiltrazione intra-articolare**

Si utilizza nella terapia conservativa dell'artrosi. Per potenziare l'efficacia di azione, viene associata ad infiltrazioni peri-articolari. L'Ozono si scioglie nel liquido sinoviale, che contiene antiossidanti quali SOD, GSH, Vitamina E,

PUFA e proteine. L'Ozono agisce riducendo l'infiammazione della sinovia, l'edema tissutale e il dolore dovuto alla sollecitazione delle strutture peri-articolari. Inoltre il miglioramento del flusso ematico favorisce la produzione di fibre collagene e il drenaggio delle sostanze flogogene<sup>[34, 44]</sup>.

### **Somministrazione endovesicale**

Questa via di somministrazione è indicata in tutti i casi di cistiti croniche, specialmente antibiotico resistenti, nel trattamento delle infezioni recidivanti delle basse vie urinarie<sup>[33]</sup>, in caso di vescica neurologica e nel trattamento dell'ematuria da chemioterapia o radioterapia<sup>[12]</sup>. Trova applicazione anche nelle infezioni renali e nell'Insufficienza Renale Cronica.

### **Uso topico**

Si utilizza acqua o olio ozonizzato, come coadiuvante nelle patologie cutanee di natura infiammatoria o infettiva e per accelerare i fenomeni di riparazione tissutale.

L'acqua ozonizzata trova impiego nella pulizia e disinfezione delle ferite. Molto diffusi nelle toelettature sono i bagni ozonizzati, che migliorano significativamente le dermatiti furfuracee<sup>[10]</sup>.

L'olio ozonizzato, invece, viene utilizzato sotto forma di creme o di colliri, ottenuti mediante gassificazione con Ozono di oli vegetali, di solito olio oliva o di girasole<sup>[48]</sup>. L'effetto terapeutico dell'olio ozonizzato è dovuto alla presenza di ozonidi, che a contatto con la cute e le mucose si scindono in bioperossidi e ossigeno molecolare. L'olio ozonizzato trova impiego per la sua azione antinfiammatoria, antalgica e antipruriginosa, antisettica e

cicatrizzante. È stato dimostrato che l'olio ozonizzato ha un'efficacia antimicrobica, in termini di inibizione della crescita di ceppi batterici di *Staphylococcus aureus*, significativamente maggiore rispetto alla clorexidina e iodopovidone<sup>[32]</sup>. Stimola inoltre il rilascio di fattori di crescita, quali FGF (Fibroblast Growth Factor), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), TGF- $\beta$  (Trasforming Growth Factor  $\beta$ ) e VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), che inducono la formazione del tessuto di granulazione, neovascolarizzazione, sintesi di collagene e riepitelizzazione<sup>[23]</sup>.

## **CAPITOLO 2**

### **MECCANISMI DI CONTROLLO DEL DOLORE MEDIANTE**

#### **OZONO**

##### ***IL DOLORE***

Secondo la definizione della IASP (International Association for the Study of Pain), il dolore è un'esperienza sensoriale ed emotiva spiacevole, associata ad un danno tissutale reale o potenziale, o percepito in termini di danno. Il dolore è quindi un fenomeno complesso, basato su componenti sensoriali-discriminative e cognitive-emozionali. Spesso risulta difficile da riconoscere ed interpretare negli animali <sup>[17]</sup>.

L'esperienza dolorifica negli animali provoca variazioni comportamentali, volte a ridurre o evitare il danno e promuovere il suo sollievo: ad esempio cambiamenti nella deambulazione, nella postura (cifosi, contrazione dell'addome), immobilità. Tuttavia il dolore in atto presenta anche molti svantaggi: è stressante per l'animale, aumenta il catabolismo, deprime l'assunzione di cibo, con conseguente perdita di peso e disidratazione, provoca la modificazione di diversi parametri fisiologici (frequenza cardiaca e respiratoria, pressione sanguigna, temperatura, ecc.) e può portare ad atteggiamenti compulsivi, fino all'automutilazione per lambimento o grattamento eccessivo della parte dolente <sup>[37]</sup>.

La risposta ad uno stimolo dolorifico è variabile secondo diversi fattori: specie, razza, età e stato di salute. I ruminanti, ad esempio, hanno una soglia di sopportazione maggiore rispetto ai carnivori. Tra le razze canine, i cani da lavoro sopportano meglio il dolore rispetto alle razze toy. Gli animali giovani, in generale, hanno una soglia di tolleranza al dolore minore, così come gli animali ammalati <sup>[28]</sup>.

### ***FISIOPATOLOGIA DEL DOLORE***

Il meccanismo mediante il quale il sistema nervoso rileva uno stimolo potenzialmente pericoloso è la nocicezione. La nocicezione consiste nella trasduzione, ovvero la trasformazione di uno stimolo nocivo in un potenziale di azione. Seguono la trasmissione, con la quale gli impulsi elettrici vengono condotti al midollo spinale; la modulazione, attraverso cui il midollo amplifica o sopprime gli impulsi; la proiezione che conduce gli impulsi all'encefalo. L'ultimo step è la percezione: gli impulsi sono integrati, processati e riconosciuti dalla corteccia.

#### **Trasduzione**

I nocicettori sono le terminazioni periferiche di neuroni sensoriali primari, specializzati nella rilevazione di stimoli dolorifici di natura meccanica, termica o chimica. I nocicettori codificano l'intensità, la durata, la localizzazione e la tipologia dello stimolo che ricevono e lo trasformano in un potenziale elettrico <sup>[35]</sup>. Si trovano in qualsiasi area del corpo in grado di

percepire stimoli nocivi. A livello superficiale sono particolarmente concentrati nella cute, cornea, timpano e nelle mucose. Nei distretti profondi si riscontrano nel tessuto muscolare, nei tendini, a livello articolare nella capsula e nei legamenti, a livello osseo nel periostio e nell'endostio, inoltre sono localizzati nell'avventizia dei vasi, nelle meningi e nelle sierose. Nei visceri cavi sono distribuiti nell'intestino, sistema biliare, vie urinarie e vescica. Sono assenti, invece, nelle cartilagini articolari, nei menischi e nei dischi intervertebrali e negli organi parenchimatosi quali fegato, cervello e rene.

Il dolore nocicettivo è un dolore fisiologico, contemporaneo allo stimolo algogeno, è acuto, breve e generalmente circoscritto. Quando, invece, lo stimolo algogeno è intenso e prolungato e reca danno tissutale, si parla di dolore patologico.

In base al meccanismo patogenetico, il dolore patologico può essere infiammatorio, neuropatico o idiopatico.

Il dolore infiammatorio è legato all'attivazione e sensibilizzazione dei nocicettori da parte di una combinazione di sostanze rilasciate a seguito del danno tissutale:  $K^+$  e  $H^+$ , prostaglandine, leucotrieni, istamina, bradichinina e serotonina (5Ht). A loro volta i recettori rilasciano la sostanza P e CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) ad azione vasoattiva, dando luogo al così detto circolo vizioso del dolore: il dolore e l'infiammazione si associano e si rafforzano reciprocamente e compaiono i fenomeni di iperalgesia (aumentata risposta percettiva agli stimoli nocivi) o allodinia (comparsa di dolore in seguito a stimoli normalmente innocui).

Il dolore neuropatico deriva da un interessamento diretto del sistema nervoso, dovuto a traumi o neuropatie di natura tossica, metabolica e infettiva. La lesione della via nervosa determina alterazioni nella ricezione e nella trasmissione dello stimolo doloroso. L'attività incontrollata delle fibre lesionate, provoca scariche ectopiche e un'ipersensibilizzazione che si autoalimenta.

### **Trasmissione**

Attraverso le fibre sensitive gli impulsi vengono trasmessi al midollo spinale. Le fibre sensitive possono essere distinte in fibre non dolorifiche A $\beta$  e fibre dolorifiche A $\delta$  e C.

Le fibre A $\beta$  hanno un calibro relativamente grande di 6-12  $\mu\text{m}$  e una velocità di conduzione dello stimolo elevatissima, pari a 35-75 m/s. Sono responsabili della percezione degli stimoli tattili e pressori.

Le fibre A $\delta$  sono mielinizzate con un diametro medio di 1-5 $\mu\text{m}$  e una velocità di conduzione di 5-30 m/s. Sono quindi fibre a trasmissione veloce. Vengono attivate da stimoli di natura meccanica, dovuti per esempio a distorsioni, traumi o versamenti, e di natura termica, temperatura superiore a 45°C o inferiore a 5°C. Sono responsabili della trasmissione del dolore iniziale e acuto: trasmettono cioè sensazioni di tipo puntorio, percepite in tempi molto brevi e proiettate su territori cutanei di dimensioni molto piccole.

Le fibre C, infine, sono amieliniche, di piccolo calibro, misurano infatti 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ , a trasmissione lenta 0,5-2 m/s. Sono polimodali: rispondono a stimoli termici, meccanici o di natura chimica (chinine, istamina, leucotrieni, interleuchine, prostaglandine, ecc.). Sono responsabili della trasmissione del dolore ritardato, lento e diffuso: trasmettono cioè sensazioni di tipo bruciante o urente, percepite con un certo ritardo e proiettate su territori ampi e poco definiti.

Tutte le fibre sensitive accedono al midollo spinale attraverso le radici dorsali dei nervi spinali e si separano per trarre connessioni con i neuroni di secondo ordine, situati nel corno dorsale<sup>[54]</sup>. A livello midollare, gli impulsi sensoriali veicolati da queste fibre, possono essere amplificati o soppressi da interneuroni eccitatori o inibitori, situati nella sostanza gelatinosa del Rolando, che utilizzano come neurotrasmettitore un oppioide endogeno, detto encefalina. Esiste un meccanismo di controllo dell'impulso, chiamato "a cancello" o Gate Control: se la fibra  $A\beta$  è attivata per uno stimolo non dolorifico, andrà a sua volta ad attivare l'interneurone inibitorio, che quindi bloccherà la trasmissione del segnale al cervello, in questo caso il cancello è chiuso; viceversa se la fibra  $A\delta$  o C trasmette uno stimolo dolorifico, si avrà un'inibizione dell'interneurone encefalinergico, in questo caso il cancello è aperto e il dolore viene percepito. Questo meccanismo inibitorio può essere attivato anche dalle vie discendenti di modulazione del dolore.

## **Modulazione**

Le fibre di trasmissione si interconnettono con neuroni di secondo ordine, situati nel corno dorsale del midollo spinale. Si distinguono due tipi di neuroni di secondo ordine: Neuroni Nocicettivi Specifici NS (Nociceptive Specific), attivati solo da stimoli dolorifici; Neuroni Non Nocicettivi Specifici, detti anche ad ampio spettro dinamico o multimodali WDR (Wide Dinamic Range), perché ricevono segnali di vario tipo, ma aumentano gradualmente l'attività nel caso in cui lo stimolo raggiunga livelli nocivi.

## **Proiezione**

Dalle lamine del corno dorsale, i fasci nervosi si incrociano a livello della commessura bianca, portandosi controlateralmente, così lo stimolo sensoriale viene proiettato all'encefalo attraverso le vie ascendenti: il tratto spino-talamico, il tratto spino-reticolare, il tratto spino-mesencefalico, che costituiscono il fascio antero-laterale, e il tratto spino-ipotalamico, che si connettono rispettivamente con:

- il talamo, la stazione di collegamento e distribuzione dei segnali alle varie aree cerebrali
- la sostanza reticolare, che influenza la coscienza (un dolore lieve aumenta l'attenzione, mentre un dolore severo può causare perdita di coscienza)

- la sostanza grigia periacqueduttale (PAG), che rappresenta il centro di controllo primario per la modulazione discendente del dolore e il sistema limbico, che regola le reazioni emozionali
- l'ipotalamo, responsabile della risposta endocrina e ormonale.

Esistono numerosi neuroni del midollo spinale a proiezione ascendente, che possiedono assoni che lungo il loro decorso si biforcano terminando in due o più strutture bersaglio dei tratti spino-talamico, spino-reticolare e spino-mesencefalico. Dunque esiste una notevole sovrapposizione fra tutte le vie ascendenti sensitive.

## **Percezione**

La percezione del dolore è data da integrazione, processazione e riconoscimento dello stimolo a livello dell'encefalo. Essendo coinvolte diverse parti dell'encefalo, il dolore provoca effetti sia a livello del sistema nervoso autonomo, sia conseguenze affettive e cognitive. La paura e l'ansia, infatti, amplificano le risposte del sistema nervoso simpatico e del sistema neuroendocrino e condizionano il comportamento dell'animale<sup>[21]</sup>.

Il dolore provoca aumento del tono simpatico, con conseguente aumento della frequenza respiratoria, a discapito di una corretta ventilazione, vasocostrizione e aumento delle resistenze periferiche, aumento della gittata, della frequenza e del lavoro cardiaco, aumento del tono dei muscoli scheletrici, che determinano aumento del metabolismo basale e quindi del consumo di ossigeno. Le risposte simpatiche riflesse influenzano

negativamente anche la viscosità ematica e il tempo di coagulazione, determinano fibrinolisi e favoriscono l'aggregazione piastrinica.

L'ipotalamo, sotto l'influenza del sistema limbico, è direttamente coinvolto nella risposta neuroendocrina agli stimoli dolorifici<sup>[18]</sup>: viene liberato il CRF, che stimola l'ipofisi ad aumentare la secrezione di ACTH, che a sua volta induce la corticale del surrene ad aumentare la liberazione di cortisolo. Si ha inoltre un aumento della secrezione dell'ormone antidiuretico, GH, cAMP, renina, angiotensina II, aldosterone, glucagone e interleuchina 1, con concomitante riduzione della secrezione di insulina e testosterone. Metabolicamente, questo si traduce in uno stato catabolico, caratterizzato da iperglicemia, aumento del catabolismo proteico e lipolisi, ritenzione renale di sodio ed acqua con maggiore escrezione di potassio e riduzione della filtrazione glomerulare.

Tutti questi effetti costituiscono la classica risposta allo stress, la cui intensità e durata dipende dal grado di danno tissutale. La risposta allo stress è un adattamento evolutivo sviluppatosi per ottimizzare la sopravvivenza nel periodo immediatamente successivo al trauma. La sua persistenza, invece, ha effetti deleteri per l'organismo. Per tanto l'attenuazione della risposta allo stress è una componente importante in ogni strategia di gestione del dolore.

## **AZIONE ANTALGICA DELL'OZONO**

L'azione antalgica dell'Ozono è strettamente collegata alla sua azione antinfiammatoria: l'Ozono agisce contemporaneamente inibendo i mediatori algogeni e potenziando il sistema antalgico endogeno.

Le sostanze liberate nella sede del danno tissutale hanno un ruolo ben preciso nel processo infiammatorio, essendo responsabili dei fenomeni vascolari e cellulari tipici della flogosi: calor, rubor, tumor, dolor e functio laesa. Le stesse sostanze, quindi, sono in grado di attivare o sensibilizzare le fibre nocicettive, attraverso reazioni di fosforilazione dei recettori di membrana e aumento dell'attività dei canali del Na.

I mediatori del dolore derivano da<sup>[50]</sup>:

- lipidi: acido Arachidonico, prostanoidi ed eicosanoidi
- proteine: NGF (nerve growth factor)
- dalle terminazioni nervose: sostanza P, neuropeptide K, CGRP
- dal sangue e dal tessuto infiammato: serotonina e bradichinina
- altre molecole: glutammato, K<sup>+</sup>, idrogenioni.

Nelle patologie discali un ruolo particolare viene svolto dalla Fosfolipasi A<sub>2</sub>, che oltre alla formazione di prostaglandine e leucotrieni, può danneggiare direttamente le fibre nervose attaccando i fosfolipidi di membrana del nervo e della guaina peri-neurale. Anche le metalloproteinasi (MMPs) hanno un ruolo di amplificazione della risposta infiammatoria. Sono un gruppo di

enzimi proteolitici, che degradano la matrice extracellulare. Nelle patologie discali attaccano il tessuto discale, nelle articolazioni concorrono alla necrosi della cartilagine articolare. L'ultimo in ordine di scoperta è il YKL4, una glicoproteina prodotta in abbondanza in seguito a lesioni articolari<sup>[49]</sup>.

L'Ozono interviene inibendo la risposta infiammatoria sia bio umorale (chinine, istamina, PG, ecc.) sia cellulo mediata (granulociti, linfociti, ecc.)<sup>[3, 50]</sup>.

L'effetto antalgico immediato è dovuto a:

- ossidazione dei mediatori algogeni che stimolano le terminazioni nervose (PG)
- inattivazione della bradichinina
- alterazione della serotonina
- neutralizzazione dei ROS endogeni
- stimolazione alla produzione di sostanze antiossidanti.

L'effetto antalgico duraturo deriva da:

- denaturazione delle proteine cellulari che producono le sostanze algogene (chininogeno o callicreina)
- inibizione dell'attivazione della Fosfolipasi A2, COX e metalloproteinasi
- alterazione del sito recettoriale delle sostanze algogene.

Inoltre l'Ozono inibisce il rilascio di proteinasi dai macrofagi e dai polimorfonucleati e stimola il rilascio di interleuchine ed interferone, con conseguente attivazione dei linfociti B e T.

Un altro aspetto fondamentale nel meccanismo antalgico dell'Ozono è rappresentato dalla sua capacità di potenziare il sistema endogeno di modulazione del dolore, stimolando il sistema inibitorio discendente e regolando il rilascio di endorfine<sup>[3, 9]</sup>. Le strutture target dell'Ozono sono la sostanza gelatinosa del Rolando, nel midollo spinale, dove si trovano gli interneuroni inibitori encefalinergici, e la sostanza grigia periacqueduttale PAG, nel mesencefalo.

La PAG riveste un ruolo cruciale nel sistema di modulazione discendente del dolore. Si tratta di una porzione di materia grigia, che circonda l'acquedotto di Silvio e proietta le sue fibre sulla parte rostrale del midollo ventro-mediale (RVM), nel quale ha sede il nucleo del raphe magnum (RMN), che proietta a sua volta i suoi assoni alle corna dorsali del midollo spinale. Una seconda via inibitoria è localizzata nel nucleo locus coeruleus e termina direttamente nel corno dorsale. I peptidi oppiacei endogeni sono intensamente sintetizzati dai neuroni presenti nella PAG, nel raphe magnum e nel corno dorsale. Inoltre, alte densità di recettori per gli oppiacei si trovano in quelle aree e ciò spiega il loro ruolo nella risposta analgesica. A livello del corno dorsale del midollo spinale, i fasci discendenti modulano e/o riducono la nocicezione rilasciando neurotrasmettitori come la serotonina, tipicamente presente nei neuroni del rafe e noradrenalina, prodotta dai neuroni presenti nel nucleo coeruleus. I neurotrasmettitori

stimolano gli interneuroni a secernere encefalina, la quale determina un'inibizione presinaptica sulle fibre A $\delta$  e C (teoria del cancello).

Si ipotizza che l'Ozono inoculato localmente induca un effetto di riflessoterapia, simile all'agopuntura chimica, che attiva il sistema antinocicettivo discendente e va a stimolare il rilascio di endorfine, le quali bloccano la trasmissione dell'impulso al talamo e alla corteccia<sup>[3, 9]</sup>.

L'effetto antalgico è dovuto anche alla locale degenerazione ossidativa dei nocicettori C, che determina un aumento della soglia di attivazione e di conseguenza si ha desensibilizzazione o ipostimolazione del recettore allo stimolo algogeno.

Contemporaneamente, l'Ozono migliora la perfusione locale, riducendo l'ischemia e l'edema; apporta ossigeno ai tessuti, migliorando il metabolismo cellulare; induce l'attivazione di enzimi antiossidanti.

Recentemente sono stati proposti anche altri meccanismi alla base dell'effetto antalgico dell'Ozono. Uno studio del 2009 di Fuccio et al.<sup>[19]</sup> ha evidenziato che l'Ozono è in grado di normalizzare l'espressione delle caspasi pro-infiammatorie in topi con neuropatia indotta mediante legatura e taglio parziale del nervo sciatico o SNI (Spared Nerve Injury). Le caspasi o cisteina-aspartato proteasi sono un gruppo di enzimi proteolitici, caratterizzati da un residuo di cisteina nel sito attivo. L'importanza delle caspasi è stata da sempre associata al loro ruolo nell'apoptosi e in altre forme di morte cellulare programmata, ma ne è noto l'intervento anche in altri meccanismi cellulari, come infiammazione, proliferazione cellulare,

soppressione tumorale, invecchiamento. Le caspasi sono suddivise in tre gruppi in base alle caratteristiche strutturali e alla funzione: caspasi infiammatorie, caspasi iniziatori dell'apoptosi e caspasi effettrici dell'apoptosi. Quelle di maggiore interesse sono la caspasi-1, caspasi-12, caspasi-8 e caspasi-2. Le prime due intervengono nel complesso dell'inflammasoma e sono responsabili del rilascio di citochine pro-infiammatorie IL-1 $\beta$  e IL-18. Le altre sono implicate nel processo di apoptosi cellulare. Inoltre la caspasi-8 gioca un ruolo importante nell'omeostasi dei linfociti T e nelle risposte immunitarie da essi mediate, mentre la caspasi-2 è implicata anche nella regolazione dei ROS. Secondo questo studio, la neuropatia periferica induce una maggiore espressione dei geni caspase-1, caspase-12 e caspase-8 nella corteccia orbito-frontale. Una singola iniezione sottocutanea di Ozono ha ridotto l'allodinia meccanica, normalizzato i livelli di mRNA caspase-1, caspase-12 e caspase-8 e ridotto la colorazione di IL-1 $\beta$  negli astrociti. L'Ozono, mediante meccanismi ancora sconosciuti, può regolare l'espressione di geni che giocano un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nel mantenimento dell'allodinia.

Un altro lavoro del 2017 di Lu L. et al.<sup>[30]</sup> ha dimostrato che l'Ozono sopprime l'allodinia meccanica e l'iperalgia termica indotte da CCI (Chronic Constriction Injury) nel nervo sciatico, mediante l'attivazione di AMPK (protein chinasi attivata dalla 5'-adenosina monofosfato). Le AMPK sono una famiglia di proteine che hanno la funzione di sensore dello stato energetico, regolando l'omeostasi energetica e lo stress metabolico. Sono attivate da alterazioni nel rapporto AMP/ATP in seguito ad una forte

richiesta energetica, per ripristinare i livelli di ATP. In sostanza, una volta attivate le AMPK inibiscono i processi anabolici che consumano ATP, come la sintesi proteica. Le prove del ruolo di AMPK nella modulazione del dolore, in termini di attenuazione dell'eccitabilità dei neuroni sensoriali, provengono da una varietà di studi sugli animali<sup>[31, 39]</sup>. L'Ozono induce la fosforilazione di AMPK nei nervi danneggiati, per aumentata produzione di ROS. I ROS, inducendo reazioni di ossidazione a livello dei complessi mitocondriali determinano una diminuzione del rapporto tra AMP e ATP, che ha come conseguenza attivazione de AMPK.

L'effetto antidolorifico dell'Ozono è quindi multifattoriale e può trovare applicazione in numerose condizioni patologiche, anche se più frequentemente nella pratica clinica degli animali da compagnia viene utilizzato per il controllo del dolore nelle patologie discali e nell'artrosi delle articolazioni sinoviali, con un'elevata percentuale di successi.

## **CAPITOLO 3**

### **ANALISI DELLE ESPERIENZE CLINICHE RIPORTATE IN LETTERATURA**

L'utilizzo dell'Ozono – Ossigeno terapia per il controllo del dolore è una pratica medica emergente negli animali da compagnia. Numerose evidenze scientifiche ne dimostrano l'efficacia nella maggior parte dei casi trattati.

In letteratura si trovano centinaia di pubblicazioni sull'utilizzo analgesico dell'Ozono nell'uomo. In Medicina Veterinaria sono ancora in numero limitato. La ragione va ricercata nel fatto che l'utilizzo dell'Ozono in campo animale è di recente introduzione. Inoltre gli istituti di ricerca che finanziano le sperimentazioni sono decisamente in numero inferiore. La maggior parte dei lavori sono stati realizzati, infatti, da liberi professionisti privati.

Sulla base dei risultati incoraggianti nell'uomo, si è cominciato a sperimentare anche in campo veterinario l'utilizzo dell'Ozono come farmaco antalgico, soprattutto nel trattamento delle ernie discali nella specie canina. Dal punto di vista patogenetico, le paratopie dei dischi sono distinte in estrusione e protrusione. Nell'estrusione del disco avviene la rottura dell'annulus fibroso, permettendo al nucleo polposo di passare del tutto o in parte nel canale vertebrale. Le degenerazioni discali che comportano estrusione sono caratteristiche delle razze condrodistrofiche e vengono

classificate come Hansen I. Il nucleo polposo va incontro a metaplasia condroide già in giovane età, che consiste in riduzione dei glicosaminoglicani e del contenuto di acqua, aumento del contenuto di collagene e mineralizzazione del nucleo, a cui conseguono degenerazione e rottura dell'annulus fibroso e quindi l'espulsione del materiale discale. La protrusione, invece, è caratteristica delle razze non condrodistrofiche e si classifica come Hansen II. I dischi intervertebrali subiscono una metaplasia fibroide del nucleo, che consiste nell'aumento di glicosaminoglicani e di acqua. Il nucleo ipertrofico causa delle fissurazioni nell'annulus, che risulta sfiancato, ma non va incontro a rottura.

Una delle prime pubblicazioni in Italia sull'utilizzo dell'Ozonoterapia nelle ernie discali risale al 2002: *“Protocollo di trattamento dell'ernia discale con Ossigeno – Ozonoterapia nel cane”* di Castrini e Prignacca<sup>[11]</sup>. Furono trattati due cani di 8 e 9 anni con ernia discale lombare L4-L5 e L5-L6, mediante iniezioni paravertebrali alla concentrazione di 30 µg/ml. Dopo solo due sedute la sintomatologia dolorosa era ridotta. Alla fine del trattamento gli animali avevano recuperato il deficit motorio e neurologico, risultando pertanto completamente guariti.

L'anno successivo 2003 Di Mauro, Smandelli e Bernardini<sup>[16]</sup> hanno pubblicato *“Utilizzo dell'Ossigeno – Ozonoterapia nel trattamento delle stenosi vertebrali toracolombari del cane”*. Anche in questo studio clinico è stata utilizzata la tecnica para-vertebrale a concentrazione di 25 µg/ml in un cane meticcio con restringimento dello spazio intersomatico T12-T13.

L'Ozonoterapia ha portato alla completa remissione della sintomatologia in sole 3 sedute.

Nello stesso anno 2003 Di Mauro e Smandelli<sup>[15]</sup> pubblicano *“Infiltrazione intraerniaria di ossigeno – ozono con guida TC in un cane bassotto”*. Con l'utilizzo della tecnica intradiscale il miglioramento della sintomatologia clinica e la normalizzazione del quadro neurologico avviene dopo soli 2 giorni dalla somministrazione della miscela gassosa, a concentrazione di 25 µg/ml. Nel 2011 uno studio più ampio sulla tecnica intra-discale di Di Mauro<sup>[14]</sup> - *“CT-Guided Intraforaminal Oxigen-Ozone Treatment for Disc Herniation in the Dog”* - riporta i risultati di 78 cani trattati tra il 2003 e il 2010, con concentrazioni di 25 µg/ml: nel 69% dei casi si è avuta la completa remissione del dolore e dei deficit neurologici. In 6 soggetti (7,5%) è stato necessario ripetere il trattamento. Solo nel 23% dei pazienti non ci sono stati miglioramenti significativi.

Anche a livello internazionale si sperimenta la tecnica intra-vertebrale. Uno dei lavori più esaustivi è quello di Han et al. del 2007<sup>[22]</sup>: *“Fluoroscopic-guided intradiscal Oxygen-Ozone Injection Therapy for Thoracolumbar Intervertebral Disc Herniations in Dogs”*. Vengono trattati 5 cani con lesioni multiple da T9 a L4 , con una singola somministrazione di Ozono a concentrazione di 32 µg/ml. In questo studio non si è valutata solo la remissione della sintomatologia clinica, ma anche le modificazioni a carico del disco intervertebrale. Dopo 5 settimane dall'intervento, la TC confermava una significativa riduzione dell'ernia, in media del 8,8%.

Studi più approfonditi hanno dimostrato che nel trattamento delle ernie discali l'Ozono agisce con un meccanismo multifattoriale, riducendo il conflitto disco – radicolare. I fattori che concorrono al dolore nell'ernia del disco sono di natura flogistica (mediatori dell'infiammazione, PG, citochine, ecc), metabolica (ischemia) e meccanica (compressione radicolare). L'Ozono non solo contrasta l'infiammazione nella sua componente cellulo-mediata e bio-umorale, ma agisce simultaneamente sulla parte degenerata del disco, provocandone la lisi e, grazie al miglioramento della perfusione, riduce l'ischemia e la compressione radicolare<sup>[3, 9]</sup>.

L'iniezione intra-discale diretta rappresenta l'evoluzione e il perfezionamento delle somministrazioni intervertebrali, poiché l'Ozono arriva direttamente sulle radici nervose sofferenti. Tuttavia in Medicina Veterinaria è meno utilizzata, perché il vantaggio rispetto all'approccio para-vertebrale indiretto è minimo e gli svantaggi sono invece maggiori: è necessario sottoporre l'animale ad anestesia generale, c'è il rischio di provocare infezioni o danni iatrogeni ed i costi sono ovviamente più elevati.

La tecnica para-vertebrale viene definita “agopuntura chimica”, perché sia l'ago sia la miscela gassosa sono in grado di provocare una serie di reazioni chimiche e neurologiche che portano alla scomparsa del dolore<sup>[3, 9]</sup>. I ROS e i LOPs generati localmente dalla dissociazione dell'Ozono, stimolano i nocicettori C, provocando un dolore transitorio, generalmente ben tollerato. Questo comporta un innalzamento della soglia di dolore e l'attivazione della via antinocicettiva discendente.

In sostanza il meccanismo d'azione dell'Ozono è multifattoriale:

- attivazione del sistema antinocicettivo ed innalzamento della soglia di attivazione per degenerazione ossidativa dei nocicettori C
- inattivazione delle sostanze algogene e inibizione della loro sintesi, in particolare l'inibizione della Fosfolipasi A2, che oltre alla formazione di prostaglandine e leucotrieni, può danneggiare direttamente le fibre nervose attaccando i fosfolipidi di membrana del nervo e della guaina peri-neurale
- miglioramento della perfusione locale che comporta la riduzione dell'ischemia e dell'edema
- maggiore apporto di ossigeno ai tessuti, che migliora il metabolismo cellulare.

In ordine temporale, uno degli ultimi lavori in Italia, in cui è stata utilizzata la tecnica para-vertebrale è di La Bruna nel 2018<sup>[25]</sup>: *“Tre casi di ernia cervicale del cane risolti con ossigeno-ozono terapia”*. Il primo animale presentava protrusione a livello di C5-C6 ed estrusione a livello C6-C7. Il secondo discopatia multipla da C4 a C7. Il terzo lieve erniazione a livello cerebellare occipitale. Tutti i cani sono stati trattati con iniezioni para-vertebrali alla concentrazione di 20 µg/ml. I miglioramenti sono stati evidenti sin dalla seconda/terza seduta ed entro la decima seduta si è avuta la remissione completa della sintomatologia.

Un altro filone di ricerca riguarda l'utilizzo dell'Ozono per il trattamento dell'artrosi<sup>[34,43]</sup>. In Medicina Veterinaria l'artrosi delle articolazioni sinoviali è una delle principali cause di dolore e zoppia, principalmente l'artrosi

dell'anca e del ginocchio. Il dolore è dato da stimoli meccanici e flogistici. Gli stimoli meccanici dolorosi, dovuti al movimento dei capi articolari incongruenti, alla distensione e tumefazione delle strutture articolari, vengono rilevati dai nocicettori presenti nella capsula articolare, nei legamenti, nel periostio e nell'osso subcondrale. Gli stimoli flogistici sono dovuti all'incremento dei mediatori chimici dell'infiammazione e PG e al rilascio di citochine pro infiammatorie, quali IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ . Concorrono ad amplificare la reazione infiammatoria le MMPs, che provocano erosione della cartilagine. L'Ozono agisce neutralizzando i mediatori algogeni, inibendo la sintesi di PG e MMPs e il rilascio di citochine<sup>[50]</sup>. Stimola inoltre la produzione dei fattori di crescita PDGF, bFGF, TGF $\beta$  che possono portare alla formazione di nuova cartilagine<sup>[23, 46]</sup>. Il rilascio locale di endorfine blocca la trasmissione del segnale nocicettivo. L'apporto di ossigeno migliora il metabolismo cellulare. L'azione sinergica di tutti questi meccanismi producono una diminuzione dell'edema, dell'infiammazione e del dolore.

Uno studio interessante del 2011 di Smandelli<sup>[45]</sup> - *"Infiltrative treatment with Oxygen-Ozone in subject with osteoarthritis"* - evidenzia l'effetto antalgico e antinfiammatorio dell'Ozono inoculato per via intra-articolare e peri-articolare. Sono stati selezionati 30 cani e 2 gatti affetti da degenerazione e infiammazione di varie articolazioni. È stata utilizzata una miscela di Ozono a concentrazione di 25 $\mu$ g/ml. Nel 20% dei soggetti si è riscontrato riduzione della sintomatologia dolorosa e della zoppia dopo circa 36-48 ore dal primo trattamento. Nel 50% dei soggetti il miglioramento è

avvenuto alla seconda somministrazione e nel 20% dopo la terza seduta. Solo nel 9% dei soggetti l'Ozono non ha dato risultati soddisfacenti, ma ha comunque ridotto la dolorabilità dell'arto.

Successivamente, nel 2013 Zanotelli et al.<sup>[52]</sup> hanno sperimentato la somministrazione intra rettale a concentrazione di 29 µg/ml, associata al trattamento locale con olio ozonizzato in un American Bull dog con artrosi del carpo - *“Oxygen-Ozone therapy in the treatment of osteoarthritis in dog. A case report”* - Dopo 7 sedute si è riscontrata marcata riduzione dell'edema e del crepitio a carico dell'articolazione. Dopo l'ottava seduta il diametro della zampa era ritornato alla dimensione del controlaterale e la zoppia era completamente scomparsa.

Un altro studio clinico interessante è del 2020 di Silva Jr et al.<sup>[44]</sup> :*“Use of reticulated Hyaluronic acid alone or associated with ozone gas in the treatment of osteoarthritis due to hip dysplasia in dogs”*. La terapia infiltrativa con acido ialuronico rientra tra le linee guida per il trattamento dell'artrosi nell'uomo. In questo lavoro l'acido ialuronico è stato utilizzato da solo e in associazione con l'Ozono, per il trattamento dell'artrosi dell'anca, conseguente a displasia congenita, in 14 cani divisi in due gruppi. Agli animali del primo gruppo è stata praticata una singola somministrazione intra-articolare di acido ialuronico. A quelli del secondo gruppo è stato associato l'Ozono a concentrazione di 45µg/ml. I cani sono stati riesaminati a 30, 60 e 90 giorni dopo la somministrazione, mediante esame radiografico e misurazione goniometrica dell'articolazione, valutazione del grado di zoppia e analisi cinetica dell'andatura. I miglioramenti sono stati

sovrapponibili nei due gruppi. Negli animali che avevano ricevuto anche Ozono il miglioramento dell'andatura era più marcato.

Alla luce di tutti questi successi terapeutici, si può affermare che anche in Medicina Veterinaria l'Ozonoterapia rappresenti una valida alternativa alle tradizionali terapie farmacologiche o chirurgiche nel controllo del dolore, dovuto a discopatie o artrosi. È inoltre un approccio mini invasivo e privo di effetti collaterali di rilievo. L'unico svantaggio è rappresentato dal fatto che l'efficacia di azione non è immediata, ma bisogna attendere almeno 24/48 ore per avere un miglioramento significativo.

Un ultimo lavoro che vale la pena di citare è “*Comparison of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy*” di Teixeira et al.<sup>[47]</sup> Questo lavoro è completamente diverso dai precedenti, perché valuta l'effetto antalgico dell'Ozono nel periodo post operatorio. Generalmente il dolore post operatorio viene trattato con FANS o oppiacei, che però possono avere effetti collaterali anche gravi, a differenza dell'Ozono. Gli autori hanno dimostrato che l'Ozono somministrato per via rettale o in agopunti ha lo stesso effetto analgesico del meloxicam nel controllo del dolore dopo intervento di ovario-isterectomia. Nello studio sono state incluse 24 cagne, divise in tre gruppi: il gruppo 1 ha ricevuto 10 mg/kg di meloxicam im; il gruppo 2 insufflazione rettale di Ozono a concentrazione di 30 µg/ml; il terzo gruppo 0,5ml di Ozono a concentrazione di 30 µg/ml iniettato NEI punti di agopuntura GB34, Sp6, St36, Liv3 e LI4. Per la valutazione del dolore sono state utilizzate la scala VAS e Glasgow modificata (MGPS). Non

si sono riscontrate differenze rilevanti nei tre gruppi. Questo è un lavoro molto significativo e apre la strada alla possibilità di altri utilizzi terapeutici dell'Ozono.

## CONCLUSIONI

In Medicina Veterinaria le pubblicazioni sull'utilizzo dell'Ossigeno – Ozono terapia per il controllo del dolore sono ancora in numero limitato, rispetto alla medicina umana. Tuttavia, tutti gli studi riportati confermano l'efficacia di azione dell'Ozono nella maggior parte dei casi trattati.

L'effetto antalgico dell'Ozono è stato dimostrato soprattutto nelle ernie e/o protrusioni discali e nell'artrosi delle articolazioni sinoviali nella specie canina, con un'elevata percentuale di successi. Inoltre, l'Ozono, comparato a FANS utilizzati abitualmente per il controllo del dolore post operatorio, ha dimostrato la stessa efficacia di azione.

Questo apre la strada ad ulteriori indagini sulle potenzialità dell'Ozono. È opportuno, quindi, approfondire ancora la ricerca in Medicina Veterinaria e sperimentare nuovi protocolli, per stilare delle linee guida sicure ed efficaci.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Bocci Velio, *Ossigeno-ozono terapia Comprensione dei meccanismi di azione e possibilità terapeutiche*. Casa Ed Ambrosiana, Edizione: 10/2000
2. Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G, *Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70*. *Mediators Inflamm.* 2007; 2001:26785
3. Bocci V, Borrelli E, Zanardi I, Travagli V, *The usefulness of ozone treatment in spinal pain*. *Drug Des Devel Ther.* 2015 May 15;9:2677-85
4. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Paulesu L, Di Stefano A, *Studies on the biological effects of ozone, 3: an attempt to define conditions for optimal induction of cytokines*. *Lymphokine Cytokine Res.* 1993;12:121-126
5. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F et al, *Studies on the biological effects of ozone: generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone*. *J Biol Regul Homeost Agents* 1998;12:67-75
6. Bocci V, Zanardi I, Borrelli E, Travagli V, *Reliable and effective oxygen-ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion*

- and ozone rectal insufflation. J Pharm Pharmacol. 2012 Apr;64(4):482-9*
7. Bocci V, Zanardi I, Travagli V, *Important details to be clarified about the effect of rectal ozone on the portal vein oxygenation. Br J Clin Pharmacol. 2011 Aug;72(2):350-1*
  8. Bocci V, Zanardi I, Travagli V, *Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. J Transl Med. 2011 May 17;9:66*
  9. Borrelli E, *Mechanism of action of oxygen ozone therapy in the treatment of disc herniation and low back pain. Acta Neurochir Suppl. 2011;108:123-5*
  10. Cabral IL, Utzig SL, Banhuk FW, Staffen IV, Loth EA, de Amorim JPA, Negretti F, Gandra RF, Ayala TS, Menolli RA, *Aqueous ozone therapy improves the standard treatment of leishmaniasis lesions in animals leading to local and systemic alterations. Parasitol Res. 2020 Dec; 119(12): 4243-4253*
  11. Castrini A, Prignacca E, *protocollo di trattamento dell'ernia discale con Ossigeno-ozonoterapia nel cane. Riv It Ossigeno-ozonoterap 2002;1:113-115*
  12. Clavo B, Gutiérrez D, Martín D, Suárez G, Hernandez MA, Robaina F, *Intravescical ozone therapy for progressive radiation-induced hematuria. J Altern Complement Med. 2005 Jun;11(3):539-41*

13. Delgado-Roche L, Riera-Romó M, Mesta F, Hernández-Matos Y, Barrios JM, Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, *Medical ozone promotes Nrf3 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients*. Eur J Pharmacol. 2017 Sep 15;811:148-154
14. Di Mauro C, *Ct-guided intraforaminal Oxygen-Ozone treatment for disc herniation in the dog*. Int J Ozone Therapy 2011;10:59-61
15. Di Mauro C, Smandelli E, *Infiltrazione intraerniaria di ossigeno-ozono con guida TC in un cane bassotto*. Riv It Ossigeno-Ozonoterap 2003;2:179-182
16. Di Mauro C, Smandelli E, Bernardini M, *Utilizzo dell'Ossigeno-Ozonoterapia nel trattamento delle stenosi vertebrali toracolombari del cane*. Riv It Ossigeno-ozonot 2003;2:81-86
17. Fernandez IV, Jones E, Welsh Em, Fleetwood-Walker SM, *Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals*. Vet Journal 2001, 174:227-239
18. Fonda D (2009), *Dolore e analgesia negli animali*. Point veterinarie, Milano
19. Fuccio C, Luongo C, Capodanno P, Giordano C, Scafuro MA, Siniscalco D, Lettieri B, Rossi F, Maione S, Berrino L, *A single subcutaneous injection of ozone prevents allodynia and decreases the over-expression of pro-inflammatory caspases in the orbito-frontal*

- cortex of neuropathic mice.* Eur J Pharmacol. 2009 Jan 28;603(1-3):42-9
20. Galiè M, Covi V, Tabaracci G, Malatesta M, *The role of Nrf2 in the antioxidant cellular response to medical ozone exposure.* Int J Mol Sci. 2019 Aug 17;20(16): 4009
21. Gaynor JS, Muir III, WW (2009), *Handbook of veterinary pain management. 2<sup>nd</sup> edition.* Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri, 2009
22. Han HJ, Kim JY, Jang Hy, Lee B, Yoon JH, Jang SK, Choi SH, Jeong SW, *Fluoroscopic guided intradiscal oxygen – ozone injection therapy for thoracolumbar intervertebral disc herniations in dogs.* In vivo 2007 jul-aug; 21 (4): 609-13
23. Hee SK, Sun Up N, Ye Wan H, Kyoung MK, Hoon K, Hyung OK, Young MP, *Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing.* J Korean Med Sci 2009;24:368-74
24. Izadi M, Bozorgi M, Hosseine MS, Khalili N, Jonaidi-Jafari N, *Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone.* Medicine (Baltimore) 2018 Nov;97(48):e12505
25. La Bruna G, *Tre casi di ernia cervicale del cane risolti con ossigeno-ozono terapia.* La Settimana Vet 2018;1068:49
26. Lacroix G, Lambré C, *Ozone et système immunitaire.* Rev Mal Respir. 1998 Dec;15(6):699-711

27. Lee TS, Chau LY, *Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of interleukin-10 in mice*. Nat Med. 2002 Mar;8(3):240-6
28. Leonardi F, *Il dolore negli animali: sintomatologia, diagnosi, terapia e prevenzione: parte 1*. bollettino AIVPA 2007/1:29-37
29. Lin Q, Weis S, Yang YH, Helston R, Rish K, Smith A, Bordner J, Polte T, Gaunitz F, Dennery PA, *Heme-oxygenase-1 protein localizes to the nucleus and activates transcription factors important in oxidative stress*. J Biol Chem. 2007 Jul 13;282(28):20621-33
30. Lu L, Pan C, Chen L, Hu L, Wang C, Han Y, Yang Y, Cheng Z, Liu WT, *AMPK activation by peri-sciatic nerve administration of ozone attenuates CCI-induced neuropathic pain in rats*. J Mol Cell Biol. 2017 Apr 1;9(2):132-143
31. Melemedjian OK, Asiedu MN, Tillu DV, Sanoja R, Yan J, Lark A, Khoutorsky A, Johnson J, Peebles KA, Lepow T, Sonenberg N, Dussor G, Price TJ, *Targeting adenosine monophosphate-activated protein Kinase (AMPK) in preclinical models reveals a potential mechanism for the treatment of neuropathic pain*. Mol Pain 2011 Sep 21;7:70
32. Montevicchi M, Dorigo A, Cricca M, Checchi L, *Comparison of the antibacterial activity of an ozonated oil with chlorheridine gluconate and povidone-iodine. A disk diffusion test*. New Microbiol. 2013 Jul;36(3): 289-302
33. Neimark AI, Nepomnyashchikh LM, Lushnikova EL, Bakarev MA, Abdullaev NA, Sizov KA, *Microcirculation and structural reorganization*

- of the bladder mucosa in chronic cystitis under conditions of ozone therapy.* Bull Exp Biol Med. 2014 Jan;156(3):399-405
34. Oliviero A, Giordano L, Maffulli N, *The temporal effect of intra-articular ozone injections on pain in knee osteoarthritis.* Br Med Bull. 2019 Dec 11;132(1):33-34
35. Parola M, Bellomo G, Robino G, Barrera G, Dianzani MU, *4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implication.* Antiox Redox Signal 1:255-284 1999
36. Paulesu L, Bocci V, Luzzi E, *Study of the biological effects of ozone: induction of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) on human leucocytes.* Lymphokine Cytokine Res 1991;10:409-412
37. Poitte T (2013), *Analgesia del cane e del gatto. Valutazione qualitativa del dolore: definizione, obiettivi e metodologia.* Le Point veterinaire n330:1-14
38. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M, *The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products.* Free Radic Biol Med. 1995 Dec; 19(6): 935-41
39. Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Kampbell JN (1999), *Peripheral neural mechanism of nociception* Wall PD Melzack R.eds- Textbook of pain 4 edition- Churchill Livingstone Inc, Philadelphia USA p 11-58

40. Re L, *Is Ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminary result.* Eur J Pharmacol. 2014;742:158-162
41. Russe OQ, Moser CV, Kynast KL, King TS, Stephan H, Geisslinger G, Niedeberger E, *Activation of the AMP-activated protein Kinase reduces inflammatory nociception.* J Pain 2013 Nov; 14(11):1330-40
42. Sciorsci RL, Lillo E, Occhiogrosso L, Rizzo A, *Ozone therapy in veterinary medicine: a review.* Res Vet Science 2020; 130:240-46
43. Seyam O, Smith NL, Reid I, Gandhi J, Jilan W, Khan SA, *Clinical utility of ozone therapy for musculoskeletal disorders.* Med Gas Res. 2018 Sep 25;8(3):103-110
44. Silva Jùnior JIS, Rahal SC, Santos IFC, Martins d JC, Michelin F, Mamprim MJ, Tomacheuski RM, Correia LECS, *Use of reticulated Hyaluronic Acid alone or associated with ozone gas in the treatment of osteoarthritis due to hip dysplasia in dogs.* Front Vet Sci. 2020 may 13;7:265
45. Smandelli E, *Infiltrative treatment with Oxygen-Ozone in subject with osteoarthritis.* Int J Ozone Therapy 2011;10:59-61
46. Soares CD, Morais TML, Araùjo RMFG, Meyer PF, Oliveira EAF, Silva RMV, Carreiro EM, Carreiro EP, Belloco VG, Mariz BALA, Jeorge-Junior J, *Effects of subcutaneous injection of ozone during wound healing in rats.* Growth Factors. 2019 Apr;37(1-2):95-103

47. Teixeira LR, Luna SPL, Taffarel MO, Lima AFM, Sousa NR, Juoquim JGF, Freitas PMC, (2013), *Comparision of intrerectal ozone, ozone administrated in acupoints and meloxicam for post operative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy*. Vet J, 197: 794-799
48. Ugazio E, Tullio V, Binello A, Tagliapetra S, Dosio F, *Ozonated oils as antimicrobial systems in topical applications. Their characterization, current applications and advances in improved delivery techniques*. Molecules 2020 Jan 14;25(2):334
49. Vaananen T, Koskien A, Paukkeri EL, Hamalainen M, Moilanen E, Voulteenaho K, *YKL-40 as a novel factor associated with inflammation and catabolic mechanisms in osteoarthritic joints*. Mediators Inflamm. 2014;2014:215140
50. Valdenassi L, *Meccanismi di azione dell'ozono*. Università di Pavia – SIOOT 2012
51. Valdenassi L, Franzini M, Simonetti V, Ricevuti G, *Oxygen-ozone therapy: paradoxical stimulation of ozone*. OI 10. 4081/ozone. 2016
52. Zanotelli J C, Leal silva CC, Moreira da Silva S, Bernadi WA, Cuna de Souza VR, *Oxygen-Ozone therapy in the treatment of osteoarthritis in dog. A case report*. Int J Ozone Therapy 2013;12:171-182
53. Wentworth P Jr, McDunn JE, Wentworth AD. Takeuchi C, Nieva j, Jones T, Bautista C, Ruedi JM, Gutierrez A, Janda KD, Babior BM, Eschenmoser A, Lerner RA, *Evidence for antibody-catalyzed ozone*

*formation in bacterial killing and inflammation. Science .2002 Dec 13;298 85601):2195-9*

54. Willis WD, Cooggeshall RE (1991), *Sensory mechanism of the spinal cord*. Plenum Press, New York (USA)