

# Das Paradox Ozon: Ozon ist ebenso ein starkes Oxidant wie ein Arzneimittel

Velio Bocci,<sup>1</sup> Emma Borrelli,<sup>2</sup> Valter Travagli,<sup>3</sup> and Iacopo Zanardi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Abteilung Physiology, Universität Siena, Siena, Italien

<sup>2</sup> Abteilung für Chirurgie und Bioengineering an der Universität Siena, Siena, Italien

<sup>3</sup> Institut für Pharmazeutische Chemie und Technologie an der Universität Siena, Siena, Italien

Online Veröffentlicht am 3.März 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).  
DOI 10.1002/med.20150 DOI 10.1002/med.20150

## Zusammenfassung:

Nach fünf Jahrzehnten, gekennzeichnet durch Empirie und einige Fallstricke, sind einige der grundlegenden Mechanismen der Tätigkeit des Ozons in der Lungentoxikologie und in der Medizin geklärt. Das gegenwärtige Wissen ermöglicht es zu erkennen, dass das längere Einatmen von Ozon sehr schädlich sein kann, in erster Linie für die Lunge und danach für den gesamten Organismus. Andererseits kann eine kleine Dosis Ozon, die gut gegen die vorhandene antioxidative Kapazität von Blut kalibriert ist, mehrere nützliche biochemische Mechanismen steuern und das antioxidative System reaktivieren. Genauer gesagt wirkt die Ozontherapie- erstens ex vivo und zweitens während der „Retransfusion“ des ozonisierten Blutes, bei der Blutzellen und das Endothel erreicht wird und „Ozonbotenstoffe“ auf Milliarden von Zellen übertragen werden, wo sie den therapeutischen Effekt generieren. So können einzelne Ozondosen, trotz eines allgemeinen Vorurteils, therapeutisch bei ausgewählten Erkrankungen des Menschen ohne irgendeine Toxizität oder Nebenwirkungen benutzt werden. Darüber hinaus sind die Vielseitigkeit und die Amplitude der positiven Wirkungen von Ozonanwendungen in der Orthopädie, bei Haut- und Schleimhautinfektionen als auch in der Zahnmedizin, sowie vieler anderer veröffentlichter Indikationen, offensichtlich geworden.

© 2009 Wiley Periodicals, Inc. Med Res Rev, 29, No. 4, 646–682, 2009 Wiley & Zeitschriften, Inc. Med Res Rev, 29, Nr. 4, 646-682, 2009

Schlüsselwörter: oxidativer Stress, Antioxidantien; oxidative Vorkonditionierung; ozonisierte Autohemotherapie

## 1. EINLEITUNG

### A. Ein kurzer historischer Rückblick

Christian Friedrich Schönbein bemerkte 1839 die Entstehung eines Gases mit einem stechenden „elektrischen Geruch.“ Entsprechend der griechischen Sprache nannte er es „Ozon und hielt eine Vorlesung mit dem Titel „Zum Geruch an einer positiven Elektrode während der Elektrolyse von Wasser“ vor der Basler Naturwissenschaftlichen Gesellschaft.<sup>1,2</sup> Nach der Chapman-Theorie wird Ozon in der Natur kontinuierlich in der Stratosphäre (25-30 km oberhalb der Erdoberfläche) durch UV-Strahlung (< 183 nm) und durch die Spaltung von atmosphärischen Sauerstoffmolekülen in zwei sehr reaktive Sauerstoff-Atome produziert. Durch eine endotherme Reaktion verbindet sich jedes dieser Atome mit molekularem Sauerstoff und bildet das triatomische Ozon.

Es wird auch bei der elektrischen Entladung von Blitzen produziert, die dabei das Entstehen von Ozon aus dem Sauerstoff in der Atmosphäre katalysiert. Ozon hat ein Molekulargewicht von 48 und ist ein bläuliches Gas mit einem stechenden Geruch und einer Wasserlöslichkeit, die zehnfach höher ist als bei Sauerstoff (49mL in 100mL, 0,02M bei 0°C), obwohl es in der Literatur auch reichlich abweichende Angaben gibt<sup>3</sup>. Während es sich in reinem Wasser sehr schnell auflöst und dem Henryschen Gesetz folgt, reagiert Ozon in "natürlichem" Wasser sofort mit den darin gelösten anorganischen und organischen Molekülen, und erzeugt dabei verschiedene freie Radikale. Ozon als Gas zerfällt spontan mit einem Halbwert von 40 Minuten bei 20°C. Das bedeutet, dass Ozon ein metastabiles Gas mit einem temperaturabhängigen Halbwert ist, es kann aber in flüssiger Form bei einer Temperatur unter -111,9°C bei einem spezifischen Gewicht von 1,571 g/mL stabilisiert werden. Die Methoden zur Ozonerzeugung gründen sich auf UV-Strahlung, Korona Entladung oder einem elektrochemischen Prozess. Industrielles Ozon wird aus Luft erzeugt, aber medizinisches Ozon darf *ex tempore* nur unter Verwendung von medizinischem Sauerstoff hergestellt werden, weil sonst u.U. gleichzeitig giftige Stickoxide erzeugt werden könnten. Der neueste medizinische Ozongenerator kann mit einer elektrischen Spannung von 5 kV bis ungefähr 14 kV betrieben werden, wobei der Spalt zwischen den Elektroden in der Lage ist, einen allmählichen Anstieg der Ozonkonzentration und des Flusses von reinem Sauerstoff, der gewöhnlich zwischen 1 und 10L/ min reguliert wird, zu modulieren. Am Schluss ist die Ozonkonzentration entgegengesetzt proportional zum Sauerstofffluss, deshalb gilt pro Zeiteinheit: Je höher der Sauerstofffluss, um so geringer die Ozonkonzentration. In der endgültigen Sauerstoff-Ozonmischung kann die maximale Ozonkonzentration nur 5% betragen.

Anmerkung des Übersetzers: Die neuesten Generatoren arbeiten mit Frequenzmodulation im Mittelfrequenzbereich um die Konzentration bei gleich bleibendem Gasfluss zu variieren. Diese Methode erfordert wesentlich kleine Ozonröhren!

## 2. VERHALTEN VON OZON

### A. Ozon als Oxidant

Ozon hat eine ringförmige Struktur, die durch die Absorption bei 253,7 nm- bei einem Abstand unter den Sauerstoffatomen von  $1.26\text{Å}$  - gemessen wird und in verschiedenen mesomeren Zuständen in dynamischem Gleichgewicht(5) existiert (Abbildung 1). Unter den oxidierenden Agentien ist es das drittstärkste ( $E = +2,076\text{ V}$ ) nach Fluorid und Persulfat. Molekularer Sauerstoff ist, da er zwei ungepaarte Elektronen enthält, ein Diradikal, aber er hat nicht das Reaktionsvermögen von Ozon und bildet bei einer schrittweisen Reduktion mit vier Elektronen Wasser. Andererseits ist Ozon, weil es eine gesättigte Anzahl von Elektronen im äußeren Ring hat, kein Radikal, aber trotzdem weit reaktiver als Sauerstoff und erzeugt einige der radikalischen Sauerstoffarten (ROS), die auch Sauerstoff während der mitochondrialen Respiration produziert. Phagozyten, die mit Pathogenen<sup>6-8</sup> reagieren, produzieren Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  und hypochlorige Säure (HClO), katalysiert durch Myeloperoxidase. Wentworth et al<sup>9,10</sup> haben postuliert, dass menschliche Endothelzellen bei atherosclerotischen Patienten Ozon produzieren könnten, -aber ihre Erkenntnisse

bleiben noch zweifelhaft<sup>11</sup>. Darüber hinaus wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die (NADPH)-oxidasen Isoenzyme von fast allen Zellen produziert, was die Relevanz von ROS im normalen Organismus anzeigt. Interessanterweise reagiert Ozon in der Gegenwart von anorganischen und/oder organischen Komplexen sofort und generiert viele verschiedene oxidierte Moleküle, wobei es selbst innerhalb weniger Sekunden verschwindet. 12

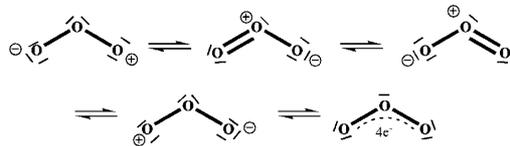


Abbildung 1: Struktur und mesomere Zustände von Ozon.

## B. Ozon als UV -Schutz

In der Stratosphäre hat Ozon eine durchschnittliche Konzentration von 10 Teilen pro Million (ppm) und es hat die wichtige Rolle, die meisten der UV-Strahlen, vor allem die Bänder B (280 bis 320 nm) und C (100 bis 280 nm) zu absorbieren, die mutagen sind und die Gefahr von Hautkrebs erhöhen können.<sup>(13)</sup> Leider haben in den letzten Jahrzehnten kurzsichtige menschliche Aktivitäten durch Freisetzung von Fluorchlorkohlenwasserstoffen in der Atmosphäre zu einer verringerten Ozonkonzentration insbesondere in der Antarktis geführt, deren Wiederherstellung mehrere Jahrzehnte brauchen könnte.

## C. Ozon als Luftverschmutzer

Andererseits sollte die Menge von troposphärischem Ozon etwa 1 µg/m<sup>3</sup> (0,001 ppm) sein, zwanzig Mal weniger als unser Schwellenwert der Geruchswahrnehmung für Ozon von etwa 20 µg/m<sup>3</sup> (0,02 ppm). Doch in den letzten Jahrzehnten, konnten die Ozonwerte in den großen Städten im Sommer bis zu gefährlichen Werten zwischen 200 und 900 µg/m<sup>3</sup> ansteigen. Darüber hinaus haben zusätzliche anthropogene Emissionen von NO, NO<sub>2</sub>, Methan, CO, Schwefelverbindungen und Feinstaubartikel die Toxizität nicht nur für die Atemwege, sondern auch für die Augen und die Haut vergrößert.

Das US Clean Air Act „US-Gesetz für Saubere Luft“ hat einen Ozonwert von maximal 120 µg/m<sup>3</sup> als 8 Std.-Mittelwert, zum Schutz der Gesundheit der Arbeitnehmer festgelegt.<sup>14</sup> Nach Einschätzung jüngster Studien,<sup>5–18</sup> können durchschnittliche Ozonkonzentrationen von 90±10 µg/m<sup>3</sup> zugelassen werden. Allerdings kann die Ozonkonzentration in der Luft in den Städten bei hoher Verschmutzung mehr als 0.8 ppm (800µg!) überschreiten.<sup>19,20</sup> Bei einem Atemvolumen von etwa 10 l / min und einer Speicherung von inspiriertem Ozon von nicht weniger als 80%, steigt die Ozondosis in 8 Stunden auf 0,70 bis 0,77 mg täglich. Dies ist wahrscheinlich die minimale Ozonaufnahme, da körperliche Aktivität die Menge der inhalierten Luft erhöht, und zu Spitzenzeiten können sich die Ozonwerte leicht 500–900 µg/m<sup>3</sup> erreichen, wobei die Lungenfunktionen verringert und das Risiko von Herz-Kreislauf-Todesfällen deutlich erhöht wird.<sup>15,17,18</sup>

Ozonwerte von 500 µg/m<sup>3</sup> mögen nicht sehr hoch erscheinen, aber man muss bedenken, dass jeder Atemzug eine Ozondosis bedeutet, die sofort mit den Flüssigkeiten auf der Atemwegsoberfläche und mit der epithelialen Auskleidungsflüssigkeit (ELF) ROS und

Lipidoxidationsprodukten (LOP) reagiert, und somit die ohnehin knappen Antioxidantien in einem flüssigen Film von ca.  $0,1\mu\text{m}$  verringert.<sup>21</sup>

Dies hat zur Folge, dass der gesamte Atemwegstrakt gegen die ständige Inhalation von ozonkontaminierter Luft nur für ein ELF-Volumen von etwa 20 – 40 mL hat<sup>22</sup>, was unbedeutend im Vergleich zu einem Plasmavolumen von etwa 2700 ml ist. Deshalb dürfen wir für den Verlauf eines Tages weder einfach die Ozon-Konzentration noch nur den Atemweg betrachten, sondern die ozonkumulative Dosis, die sich in 5 Monaten leicht auf 1 – 2 g Ozon summieren kann. Während Ozon in der ELF<sub>23</sub> verschwindet<sup>24–28</sup>, schädigen die generierten ROS, LOP und NO-arten die epitheliale Auskleidung. Die Phosphorylierung einer Proteinkinase ermöglicht durch die Aktivierung des nuklearen Faktors  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) die Synthese und Freisetzung einer Reihe von Zytokinen wie TNF<sub>OC</sub>, IL-1, IL-8, IFN<sub>Y</sub>, and TGF<sub>01</sub>. Außerdem startet diese Situation einen Teufelskreis, weil der verstärkte Zustrom von Neutrophilen und aktivierten Makrophagen in den alveolaren Raum die Produktion von mehr ROS einschließlich HClO<sup>8,26</sup>, Tachykinins, Proteasen, Alkenalen und F<sub>2</sub>-Isoprostanen steigern<sup>25,29</sup>, die in der Lage sind eine chronische Entzündung selbst aufrecht zu erhalten. ROS haben eine sehr kurze Halbwertszeit und schädigen vor allem die Mikroumgebung der Lungenbläschen, während Alkenale und entzündungsfördernde Zytokine von der großen Ausdehnung (ca. 70m<sup>2</sup>) der gesamten bronchialalveolaren Fläche absorbiert werden. Aktuelle Studien<sup>25,30,31</sup> haben, 4-hydroxynonenal (4-HNE), Isoprostane, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, und Malondialdehyd (MDA) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit festgestellt. Die interessante Studie von Last et al.<sup>32</sup> hat eindeutig gezeigt, dass Mäuse, die 1 ppm für 8 Std. während drei aufeinander folgenden Nächten ausgesetzt werden, etwa 14% ihres ursprünglichen Körpergewichts verlieren, ihre Nahrung um 42% senken, und in einen cachektischen Status übergehen. Ein weiterer wichtiger Aspekt der pulmonalen Ozontoxizität ist seine Nachwirkung auf den gesamten Organismus, vor allem auf das Gefäßsystem, Herz, Leber, Gehirn und Nieren. Das toxikologisch-pharmakologische Verhalten der beiden Verbindungen von LOP, Ceramidsignalisierung und proinflammatorische Zytokine, wird durch eine kontinuierliche Absorption aus dem pulmonalen Bereich in das Blut charakterisiert und obwohl die Halbwertszeit dieser Verbindungen kurz ist,<sup>28,33–37</sup> sichert die ständige endogene Synthese eine konstante Toxizität, was die erhöhte Morbidität und Mortalität der Bevölkerung erklärt, die die verunreinigte Luft mehrere Monate im Jahr einatmet.

#### **D. Ozon als biologisch-zytotoxischer Wirkstoff**

Sowohl normale als auch neoplastische Zellen in der Kultur sind sehr empfindlich, wenn sie konstant Ozon ausgesetzt sind, selbst wenn das Gas eine sehr geringe Konzentration hat.<sup>38–40</sup> Diese Beobachtung ist korrekt, aber sie hat zu dem irreführenden Schluss geführt, dass Ozon immer zytotoxisch ist. Tatsächlich wissen wir nur zu gut, dass Zellkultur Studien meist mit Luft-CO<sub>2</sub> bei pH 7,3 aber mit einem pO<sub>2</sub> von 160 mmHg durchgeführt werden, d.h. mit mehr als dem Doppelten von Zellen in vivo. Noch wichtiger ist die Tatsache, dass die Kulturmedien einen signifikant geringeren Spiegel von Antioxidantien als Plasma haben, insbesondere von Albumin.<sup>41–45</sup> In der Tat wird das übliche fötale Kälberserum mit einer 5-10% Konzentration hinzugefügt, die kaum 50% des Eiweißes Albumin entspricht, das in der extrazellulären Flüssigkeit vorhanden ist. Unter den Antioxidantien gehört Albumin mit der ihm zur Verfügung stehenden –SH reduzierenden Gruppe zu den schützendsten Verbindungen.<sup>46</sup> Darüber hinaus werden antioxidative Komponenten in vitro nicht dynamisch wieder aufgefüllt, während die Zellen, einer konstanten Ozonkonzentration ausgesetzt bleiben. Natürlich löst sich Ozon in der Flüssigkeit innerhalb von Sekundenbruchteilen auf, erschöpft

aber die knappen Antioxidantien und erzeugt giftige Verbindungen, die weder einer Verdünnung mit extrazellulärer Flüssigkeit noch der Ausscheidung unterliegen. Diese ungünstige Situation entsteht, wenn Stoffe, die auf Thiobarbitursäure (TBARS) reagieren, in vitro bei 37° C inkubiert und mit einem pH-Wert von 7,3 in menschlichem ozoniertem Plasma für 9 Stunden auf einem konstanten Niveau bleiben.<sup>47</sup>

Andererseits ging das in TBARS ozonisierte Blut mit einer Halbwertszeit von  $4,2 \pm 1,7$  min<sup>48,49</sup> nach einer intravenösen Infusion bei Patienten mit altersbedingter Makula-Degeneration (AMD) sehr schnell zurück, was die Relevanz der kritischen pharmakologischen Eigenschaften deutlich macht, die extensiv in Abschnitt 4A zu diskutieren sind. Darüber hinaus hat die schädliche Wirkung des Ozons auf die mit Kochsalzlösung gewaschenen Erythrozyten, die dem Plasma völlig vorenthalten wurden, merklich dazu beigetragen, Ozon als schädliches Gas zu betrachten.

### 3. DARF OZON ALS ARZNEIMITTEL BENUTZT WERDEN?

Auf den ersten Blick, verwirft die stark oxidierende Wirkung des Ozons die Möglichkeit, dass dieses Gas therapeutische Wirkung zeigen könnte.

Doch sogar heute noch befürworten einige Ozontherapeuten die wunderliche Idee, dass Ozon durch die Zersetzung im Blut dem Körper seine innere Energie, die während ihrer Synthese angehäuft wurde, abgibt, wie hier gezeigt wird:



Im 19. Jahrhundert wurde Ozon bereits als eine stark bakterizides Gas identifiziert und es wurde während des Ersten Weltkriegs für die Behandlung von deutschen Soldaten verwendet, die durch gasförmige Gangrän durch Clostridium-anaerobe Infektionen betroffen waren. In zwei Pionierstudien berichtete Stoker<sup>50,51</sup> über die ersten 21 medizinischen Fälle, die im Königin-Alexandria-Militärhospital erfolgreich mit Ozon behandelt wurden. Es bleibt unklar, ob ein Schweizer Zahnarzt, E.A. Fisch (1899-1966)<sup>52</sup>, als erster die Idee hatte, in seiner Praxis Ozon entweder als Gas oder als ozonisiertes Wasser zu verwenden. Durch eine Ironie des Schicksals musste ein Chirurg, Dr. E Payr (1871-1946), wegen einer gangränösen Pulpitis behandelt werden und über das Ergebnis mit einer lokalen Ozonbehandlung erstaunt war. Begeistert weitete er diese Anwendung auf die allgemeine Chirurgie aus und auf dem 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (Berlin, 1935) berichtet er „Welches andere Desinfektionsmittel würde besser als Ozon geduldet werden? Die positiven Ergebnisse bei 75% der Patienten, die Einfachheit, die hygienischen Bedingungen und die Sicherheit der Methode sind nur einige der vielen Vorteile.“<sup>53</sup> Im Jahr 1936 behandelte ein französischer Arzt, Dr. P. Aubourg erfolgreich chronische Kolitis und Mastdarmfisteln durch das direkte Einblasen einer Sauerstoff-Ozonmischung in den Mastdarm. Es scheint, dass Dr. Payr der Erste war, der eine kleine Menge des  $\text{O}_2\text{O}_3$  Gases direkt in die menschliche Cubitalvene injizierte, was zu einem Verfahren führte, das in den 90er Jahren, von Scharlatanen angenommen, so gefährlich wurde, dass es verboten werden sollte. Nach der Erfindung des ersten medizinischen Ozongenerators durch den Physiker Joachim Hänsler (1908-1981) gebührt dem Arzt Hans Wolff (1927-1980) Anerkennung für die Entwicklung der ozonisierten Eigenblutbehandlung ( $\text{O}_3$ -AHT) durch Insufflation des Gases Ex-vivo in eine ozonresistente Glasflasche.

Seit fast drei Jahrzehnten wurde die Ozontherapie in Deutschland verwendet, aber der Mangel an wissenschaftlichen und klinischen Studien sorgte für Skepsis und Vorurteile, die noch allgemein bestehen. Ohne Wissen um die Komplexität der biologischen Mechanismen schrieb ein bekannter Chemiker, „Ozon ist giftig, egal, wie Sie damit umgehen, und sollte in der Medizin nicht verwendet werden (persönliche Mitteilung an V.B.).“<sup>54</sup> Diese negative

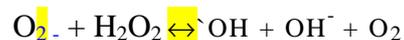
Darstellung kann nur durch validierte wissenschaftliche und klinische Daten geändert werden. Es lohnt sich zu erwähnen, was Timbrell<sup>55</sup> in seinem Buch „The Poison Paradox, Chemicals as Friends and Foes“ (Das Giftparadox, Chemikalien als Freunde und Feinde) schrieb: „Die wesentlichen Fakten sind, dass es erstens die Dosis ist, die eine Chemikalie giftig macht, und zweitens und noch wichtiger, dass Toxizität aus der Wechselwirkung zwischen chemischem und biologischem Schutz resultiert. In der Tat kann die Raffinesse und Komplexität biologischer Systeme das Konzept, das Ozon immer giftig ist, herausfordern. Interessant ist, dass Paracelsus (1495-1541) nichts von Biochemie wusste, aber vermutete, „Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift, nur die Dosis macht, dass etwas nicht giftig ist“<sup>56</sup>.

#### 4. BIOLOGISCHE MECHANISMEN, AUSGELÖST DURCH OZON IM MENSCHLICHEN BLUT

Wie erwähnt verschwindet Ozon als Gas in reinem Wasser in 5 min, in einer geschlossenen Glas-Flasche bleibt die Konzentration (ca. 25% der Ozonkonzentration im Gasgemisch) über viele Stunden relativ stabil. Aber in einer physiologischen Umgebung reagiert es sofort mit Antioxidantien, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA), Proteinen, Kohlehydraten und, wenn es im Übermaß vorhanden ist, mit DNA und RNA.<sup>57,58</sup> Auf diese Art führt Ozon zur Bildung von ROS, LOP und einem variablen Anteil von oxidierten Antioxidantien.<sup>59,60</sup>

##### A. Reaktionen mit Plasmakomponenten

Blut ist ein ideales Gewebe, weil es aus etwa 55% Plasma und Zellen besteht, insbesondere der Erythrozyten, die in der Lage sind zur „Zähmung“ der Oxidationseigenschaften von Ozon beizutragen. Das Plasma hat eine Fülle von hydrophilen Reduktionsmitteln, wie Ascorbinsäure (-50 mM), Harnsäure (-400 mM) und eine kleine Menge von reduziertem Glutathion (GSH). Diese Verbindungen wurden vor und nach der Ozonisierung gemessen.<sup>61-63</sup> Plasma enthält Albumin (~45 mg /mL), das - wegen einer Fülle von -SH-Gruppen - eine der wichtigsten Antioxidantien ist, und weil der Plasma-Pool ungefähr 112g Eiweiß Albumin enthält.<sup>46</sup> Ausserdem löscht die Anwesenheit von Proteinen wie Transferrin und Ceruloplasmin oxidierende Reaktionen durch Chelatbildung von Übergangsmetallen (vor allem Fe<sup>2+</sup> und Cu<sup>1</sup>). Die Anwesenheit von Spuren dieser Metalle muss vermieden werden, weil sie entweder in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, über die Fentonsche Reaktion, oder in der Gegenwart von Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) über die Haber-Weiss Reaktion, die Bildung der höchst reaktiven Hydroxyl-Radikal <sup>•</sup>OH katalysieren.



Obwohl <sup>•</sup>OH eine Halbwertszeit von 1 x 10<sup>-9</sup> sec hat, reagiert es mit jedem anderen Molekül und produziert ein weiteres Radikal. Blutzellen enthalten nicht nur die große Menge an GSH (1-5mM), sondern auch Thioredoxin und verschiedene lipophile Bestandteile wie alpha-Tocopherol, Retinol, Lycopin, Ubiquinol und eine alpha-Liponäure, die in der zusammen in der Lage sind oxidierte Bestandteile zu reduzieren und dadurch den anfänglichen antioxidanten Status wieder herzustellen. Darüber hinaus enthalten Blutzellen verschiedene Enzyme (SOD, Katalase, GSPase, GSH-Redoxsystem), die entweder gleichzeitig oder nacheinander zur Wiederherstellung des Redoxsystems kooperieren. Die in den letzten 18 Jahren in unserem Labor durchgeführten Arbeiten haben die wichtigsten Verbindungen geklärt, die ex vivo während der Anfangsreaktion von Ozon mit einigen Plasmakomponenten gebildet werden,

und wie diese Verbindungen einige biochemische Stoffwechselwege in den Zellen aktivieren. Die therapeutische Wirkung beim Patienten nach der Transfusion von ozonisiertem Blut konnte dadurch erklärt werden.

Die biochemischen Wirkungen, die Ozon aufweist, wenn es mit Blutkomponenten in Kontakt kommt, sollen kurz betrachtet werden.<sup>47,63</sup> Nachdem Tausende von Behandlungen durchgeführt wurden, ist das Standardverfahren, 200mL eines Gasgemisches (von medizinischem Sauerstoff besteht > 95 % mit Ozon <5%) zu 180mL Blut hinzuzufügen, nachdem zuvor 20mL von 3,8% Natriumcitrat bei Raumtemperatur hinzugefügt wurden. Die Blut-Gasvolumina werden vorsichtig in einer sterilen Glasflasche durch Rotation vermischt, wobei Gasblasen vermieden werden. >( Kein Microperl-System ! ) Innerhalb von 5 min lösen sich ca. 1,5 mL von O<sub>2</sub> und 2,4 mL O<sub>3</sub> im Plasmawasser, aber ihre Reaktionswege sind völlig verschieden. Sauerstoff diffundiert physisch in die Erythrozyten und sättigt vollständig Hämoglobin (Hb<sub>4</sub>O<sub>8</sub>). Aber obwohl der p<sub>O</sub><sub>2</sub> mit 450 mmHg hoch ist, ist der therapeutische Wert der Sauerstoffversorgung irrelevant, da die sukzessive Infusion von mit Sauerstoff angereichertem Blut (ca. 15 ml / min) den p<sub>O</sub><sub>2</sub> (~40 mmHg) mit einem gleichzeitigen Zustrom von venösem Blut zum Herzen von ca.5 L / min kaum ändert. Im Gegenteil, Ozon löst sich leichter in Plasmawasser als Sauerstoff und reagiert sofort mit wasserlöslichen Antioxidantien und mit leicht verfügbarem PUFA, das an Albumin gebunden ist.

Durch die Benutzung eines zuverlässigen Ozongenerators, der in der Lage war präzise Ozonkonzentrationen zu produzieren, war das erste Ziel vor einigen Jahren zu bestimmen, ob Ozon in der Tat immer schädlich ist, oder ob ein Bereich von ozontherapeutischen Konzentrationen ermittelt werden konnte. Der Bereich wurde zwischen 10µg/mL/ml (0,21 µmol/mL) und 80 µg/ml Gas (1,68 µmol/ml) pro ml antikoaguliertem Blut beschränkt, was insgesamt einer totalen Ozondosis zwischen 1 und 8 mg für 100 ml Blut entspricht. Es war von entscheidender Bedeutung, die Ozondosis präzise zu kalibrieren (Gasvolumen x Ozonkonzentration) gegen die variable antioxidative Kapazität des Patientenblutes, wodurch einerseits Ozontoxizität vermieden und auf der anderen Seite die Aktivierung von verschiedenen biochemischen Wegen auf Blutzellen aktiviert wurde. Es wurde bewiesen, dass während der langsamen Vermischung des Blutes mit der Gasphase, das gesamte Ozon in weniger als 5 min verbraucht ist. Mehrere Studien<sup>47,51,59,63-65</sup> haben klargelegt, dass sich einige Albumine und Harnsäure, als Opfermoleküle verhalten, während mehrere Antioxidantien nach Oxidation rasch durch ein effizientes Recyclingsystem gesenkt werden.<sup>66,67</sup>

Einiges von dem Ozon reagiert mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie folgt:



und führt zu der gleichzeitigen Bildung von 1 mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bem.: ROS enthalten) und 2 mol von LOP.<sup>23, 68,69</sup>

Das grundlegende ROS-Molekül ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das nicht ionisiert ist, somit ein Oxidationsmittel, das in der Lage ist, als ein „Ozonbote“ für die Auslösung mehrerer biologischer und therapeutischer Effekte zu agieren.<sup>70-75</sup>

Wie bereits erwähnt wurde das alte Konzept, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> immer schädlich ist, völlig revidiert, da es in physiologischen Mengen als Regulator der Signalübertragung agiert und eine wichtige Vermittlerrolle der Abwehr und Immunreaktionen darstellt.<sup>74,76-80</sup> Während die

Anwendung von Sauerstoff ineffektiv ist, verursacht Ozon die Erzeugung von  $H_2O_2$  und der chemilumineszenten Reaktion sowohl in physiologischer Kochsalzlösung wie auch im Plasma.<sup>47,81</sup>

Doch während es in Kochsalzlösung einen stetigen und längeren Anstieg von  $H_2O_2$  gibt, steigen im ozonisierten Plasma sowohl die Chemilumineszenz als auch das  $H_2O_2$  sofort an, zerfallen aber sehr schnell mit einer Halbwertszeit von weniger als 2 min wobei dies darauf hindeutet, dass sowohl Antioxidantien als auch Spuren von Enzymen  $H_2O_2$  sehr schnell zu Wasser reduzieren.<sup>47</sup>

In ozonisiertem Blut ist die Verringerung von  $H_2O_2$  so schnell, dass es experimentell unmöglich ist, sie zu messen.

$H_2O_2$  kann leicht durch die Zellmembran passieren, aber die extrazelluläre Konzentration lässt die intrazelluläre nur um 1/10 ansteigen.<sup>72,74,78</sup>

Ihre relative Stabilität ermöglicht es, sie im Plasma zu messen, in normotensiven Probanden ist seine Konzentration  $2,5\mu M$ .<sup>70, 71</sup> In diesem Fall wird die

intrazelluläre Konzentration von  $H_2O_2$  höchstens  $0,25\mu M$  betragen, während die maximale intrazelluläre Konzentration, die für Anzeigezwecke während des Ozonisierungsprozesses generiert werden kann,  $0,5-0,7\mu M$ <sup>47</sup> erreichen kann.

$H_2O_2$  scheint allgegenwärtig zu sein, weil es im Urin wie auch in der Atemluft nachgewiesen wurde.<sup>71</sup> Je nach der örtlichen Konzentration und dem Zelltyp,

kann  $H_2O_2$  entweder Proliferation oder Zelltod induzieren.<sup>78,80,82,83</sup> Es kann den Gefäßtonus regulieren, indem es Verengungen der Gefäßbetten oder

Vasodilatation verursacht, obwohl es ungewiss bleibt, ob es als EDHF

“endothelium-derived hyperpolarizing factor“ agiert.<sup>84</sup>

Ein sehr aufschlussreiches Ergebnis wurde durch die Bewertung der Variation des gesamten antioxidanten Status (TAS) gefunden, wie es durch die Rice-Evans und Miller-Methode im Plasma nach der Ozonisierung und nach 1 min schnellem Vermischen des Flüssiggases mit entweder frischem Blut oder dem jeweiligen Plasma derselben zehn Spender gemessen wurde.<sup>85</sup>

Abbildung 2 zeigt, dass der TAS-Wert nach der Ozonisierung von Plasma entweder mit einer Mittel- oder einer Hochkonzentration von Ozon ( $0,84\mu mol/ml$  bzw.  $1,68\mu mol/ml$  Gas pro ml Plasma), zunächst allmählich sinkt und dann nach 20 min stabil bleibt.<sup>47</sup>

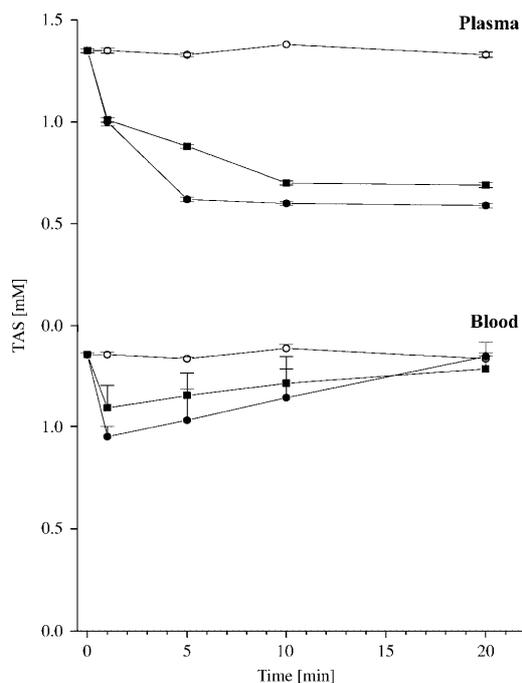


Abbildung 2: Kinetik der TAS Niveaus im Plasma (oben) und im Blut (unten) Proben von Spendern (n = 10; Mittelwert  $\pm$  SD, unveröffentlichte Ergebnisse). Plasma- und Blutproben wurden für 1 min entweder O<sub>2</sub> (Kontrolle) oder O<sub>2</sub> - O<sub>3</sub> mit Ozon-Konzentrationen von 40 (Quadrat) und 80 (Kreis)  $\mu$ g/mL ausgesetzt.

Der Rückgang war ozondosisabhängig und schwankte zwischen 46% bzw. 63%. Im Gegensatz dazu nahmen TAS-Spiegel im Blut, die mit der gleichen Ozonkonzentration behandelt wurden, in den ersten Minuten nach der Behandlung mit Ozon nur entsprechend um 11% bis 33% ab.

Dann erholten sie sich wieder und kehrten innerhalb von 20 min auf den ursprünglichen Wert zurück, unabhängig von den beiden Ozonkonzentrationen, die die große Kapazität von Blut zeigten, oxidierte Antioxidantien, nämlich Dehydroascorbat und GSH-Disulfid (GSSG) zu regenerieren. In der Tat haben Mendiratta et al.<sup>66, 67</sup> festgestellt, dass Dehydroascorbat innerhalb von 3 min zu Ascorbinsäure zurückgebildet werden können. In ähnlicher Weise wurden nur etwa 20% der intraerythrozytischen GSH innerhalb von 1 min nach der Behandlung mit Ozon zu GSSG oxidiert vorgefunden, reduzierten aber prompt nach 20 min zu normal.<sup>86</sup> Diese Daten waren aufschlussreich und zeigten, dass die therapeutische Behandlung mit Ozon nur vorübergehend und reversibel die zelluläre Redoxhomöostase modifiziert. Es besteht jetzt völlige Einigkeit, dass Ascorbinsäure, alpha Tocopherol, GSH, und Liponsäure nach Oxidation eine geordnete Reduktion durch eine gut koordinierte Folge von Elektronenabgaben durchlaufen.<sup>87</sup>

Die LOP-Produktion folgt der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) im Plasma: Sie sind heterogen und können als Lipoperoxide (LOO), Alkoxy-Radikale (LO), Lipohydroperoxide (LOOH), F<sub>2</sub>-Isoprostane und Alkenale eingestuft werden, darunter 4-Hydroxynonenal (4-HNE), Acrolein und MDA. Als freie Radikale und Aldehyde sind sie in sich schädlich, nur präzise und angemessene Ozondosen dürfen verwendet werden, um sie in sehr niedrigen Konzentrationen zu erzeugen. Abbildung 3 zeigt vergleichsweise die Änderungen der Plasmaspiegel von TBARS, Hämolyse, TAS, und Proteinthiolen, als 13 menschliche Blutproben in einem typischen Experiment der Luft, O<sub>2</sub> oder entweder 40 oder 80 mg/ml Ozon-Konzentrationen ausgesetzt wurden. Plasma TBARS in vitro sind viel stabiler als ROS,<sup>47</sup>, aber bei Blutinfusion haben sie dank einer starken Verdünnung in Körperflüssigkeiten, Ausscheidungen (über Urin und Galle), Stoffwechsel von Glutathion-S-Transferase (GST) und Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) eine kurze Halbwertszeit.

Unter den Aldehyden ist 4-HNE quantitativ das wichtigste. Es ist ein amphipathisches Molekül und reagiert mit einer Vielzahl von Verbindungen wie Albumin, Enzymen, GSH, Carnosin und Phospholipiden.<sup>88, 89</sup> Es gibt keinen Rezeptor für 4-HNE, aber Poli et al.<sup>89</sup> haben berichtet, dass es nach Bindung an mehr als 70 biochemische Ziele einige schädliche Aktivitäten ausübt. Glücklicherweise sind die intrazellulären Konzentrationen von GSH hoch genug, um die Verbindung von 4-HNE mit Enzymen oft zu verhindern oder zu beseitigen. Wegen der unerwarteten Stabilität von 4-HNE, wenn Proben von ozonisiertem Blutplasma bei 37°C für 9 Stunden inkubiert wurden, wurde postuliert, dass Ozon es wegen seiner hohen Löslichkeit im Plasmawasser, aus sterischen Gründen, und wegen der Fülle von Eiweißmolekülen vorzieht, die mehrfach ungesättigten Fettsäuren anzugreifen. Das Schema, das in Abbildung 4 präsentiert wird, veranschaulicht die Ereignisse in der Plasmaphase. Es scheint vernünftig anzunehmen, dass während der schnellen Reaktion von Ozon mit Albumin PUFA in Wasser die plötzlich generierten Aldehyde, vor allem 4-HNE, sofort Addukte mit zusammenhängenden Eiweiß-Moleküle bilden. Diese Hypothese wird nun auch durch die jüngsten Erkenntnisse unterstützt,<sup>90-92</sup> die gezeigt haben, dass menschliches Albumin, reich an zugänglichen nukleophilen Resten, bis zu 11 verschiedene 4-HNE Moleküle löschen können: das erste mit Cys34, gefolgt von Lys 199 und His 146. Diese wichtigen Daten erklären, warum Ex-vivo-Behandlung von Blut mit Ozon keine Nachteile für das Kreislaufsystem während der Infusion von ozonisiertem Blut hat. Die Albumin-4-HNE-Addukte werden nicht nur schnell im Blutpool verdünnt, sondern stellen, da sie in den extravasculären Pool transferiert werden, nur einen kleinen Teil des gesamten Albuminpools dar, der etwa 310 g Protein enthält. Auf dieser Grundlage wäre es lohnend zu untersuchen, ob entweder das 4-HNE-modifizierte Albumin ein abnormes Schicksal hat oder ob das Aldehyd in andere Zellbereiche freigesetzt wird und dadurch in der Lage ist, biochemische Mechanismen auszulösen. 4-HNE ist das wichtigste Produkt der Peroxidation von n-6-PUFA, dessen Konzentration in normalen Plasmazellen zwischen 0,07 und 0,15 mM variiert und mit dem Alter ansteigt.<sup>93,9</sup>

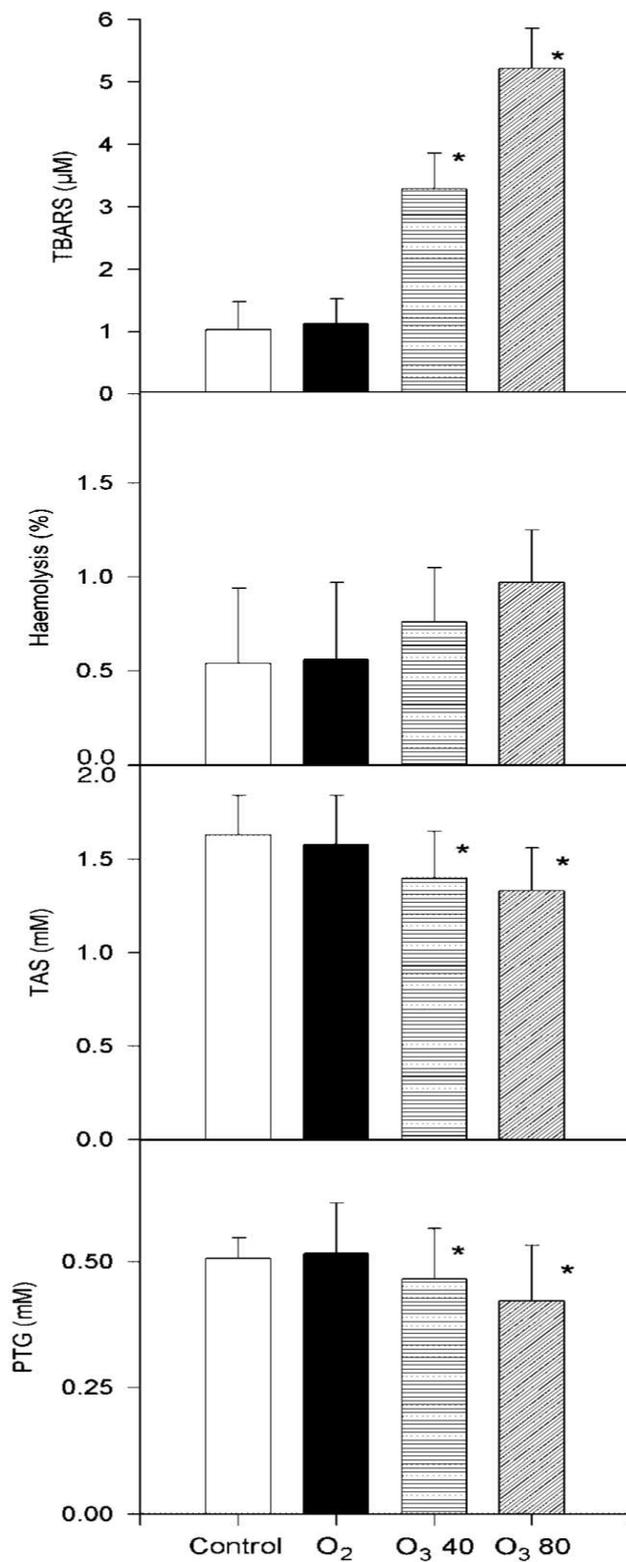
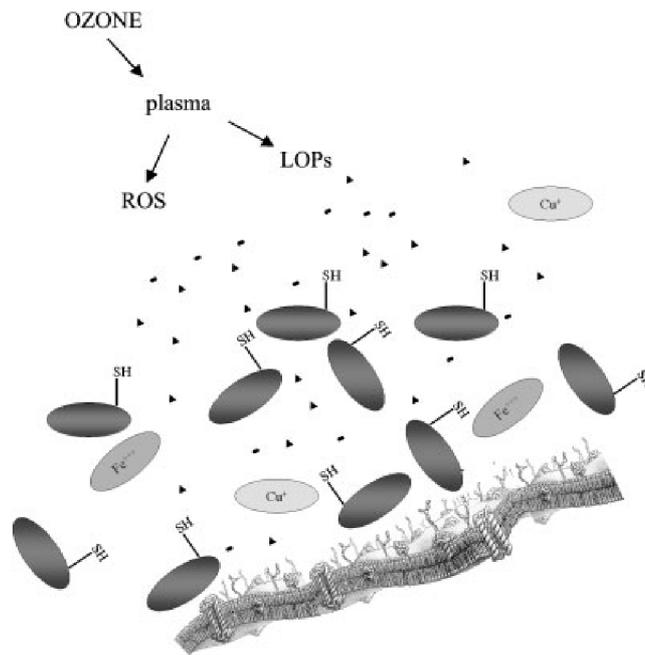


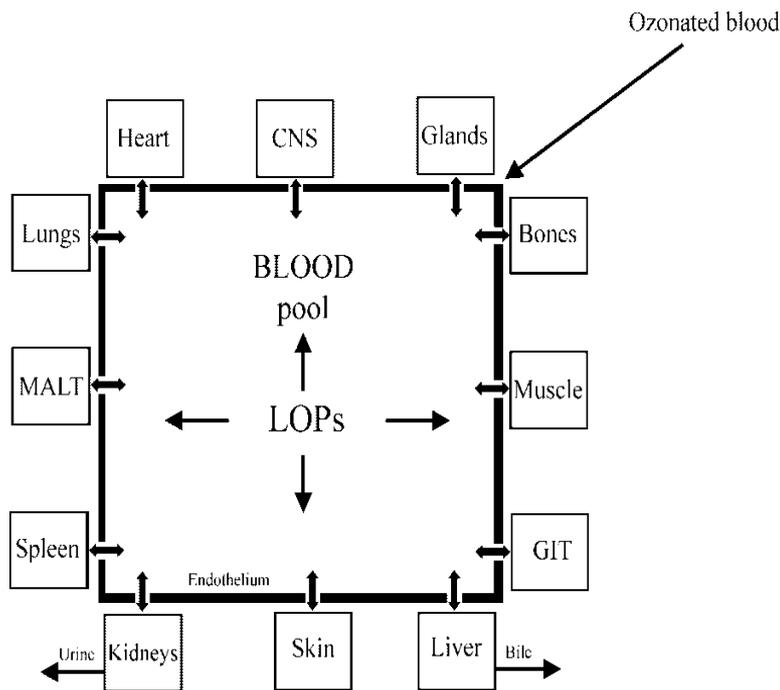
Abbildung 3. Dreizehn Humanblutproben wurden für 1 Minute der Luft (Kontrolle) oder O<sub>2</sub> oder O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> mit Ozonkonzentrationen von 40 und 80 μg/mL ausgesetzt. Während die TBARS-, TAS- und PTG-Werte sich signifikant nach der Behandlung mit Ozon unterscheiden (p < 0,01) gibt es einen zu vernachlässigenden geringfügigen Anstieg der Hämolyse. (Bocci V. Wie agiert Ozon? Sauerstoff - Ozon-Therapie. Eine kritische Beurteilung, Kap. 13. Abbildung 40. Kluwer Academic Publishers, 2002. P 114. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science+Business Media, ehemals Kluwer Academic Publishers )



**Abbildung 4.** Das Schema trägt dazu bei, sich die Vielfalt der Substrat-Reaktion des im Plasmawasser gelösten Ozons vorzustellen. Kleine Kreise, Dreiecke und Quadrate symbolisieren wasserlösliche Antioxidantien, die in 100 ml menschlichem Blut (Harnsäure 4,5 mg/dl, Ascorbinsäure 1,5 mg/dl, Glucose 80 mg/dL, etc. ...) vorhanden sind. Große Eiweiß-Moleküle (4.000 mg/dL), die -SH-Gruppen exponieren, bilden eine Wolke über der Zellmembran und schützen sie. Moleküle wie Transferrin und Ceruloplasmin binden Fe<sup>3+</sup> und Cu<sup>+</sup> und verhindern die Bildung von OH<sup>•</sup>. Die exogene Zugabe von 4 bis 8 mg Ozons zu 100 mL Blut ist vorübergehend und kontrolliert durch Antioxidantien. Im Gegensatz dazu ist die endogene Produktion von ROS kontinuierlich und kann kaum durch intrazelluläre Antioxidantien abgefangen werden.

Es ist wohl unnötig zu betonen, dass ein konstanter Anstieg der Peroxidation wie er nach Ischämie-Reperfusion(=Wiederdurchblutung), CCl<sub>4</sub>-Vergiftung, ADP-, „Eisenüberladung“ und chronischen Entzündungen geschieht, die typisch für einige Infektionserkrankungen, Diabetes, Arteriosklerose, Krebs und degenerativen Erkrankungen sind, zu einem deutlichen Anstieg der 4-HNE Werte, insbesondere in den betroffenen Geweben führt.

Aerobe Organismen haben jedoch zum Ausgleich der Toxizität von Aldehyd-Verbindungen gleichzeitig entgiftende Systeme entwickelt<sup>37,95-99</sup> und deren Bewertung ist relevant, weil die Infusion des ozonisierten Bluts in den Patienten ein Quantum Albumin-4-HNE-Addukt beinhaltet.



Von oben links im Uhrzeigersinn: Herz, CNS (zentrales Nervensystem), Drüsen, Knochen, Muskel, GIT (gastrointestinaler Trakt), Leber, Haut, Nieren, Milz, MALT (schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe), Lungen

Abbildung 5. Die multivariable biologische Reaktion des Organismus auf ozonisiertes Blut kann man sich so vorstellen, dass ozonisierte Blutzellen und die erzeugte LOP mit einer Reihe von Organen interagieren. Einige von ihnen stellen echte Ziele dar (die Leber bei chronischer Hepatitis, das Gefäßsystem bei Vasculopathien), während andere Organe wahrscheinlich bei der Wiederherstellung der normalen Homeostase beteiligt sind, so der Gastrointestinale Trakt (GIT); das schleimhautassoziierte lymphatische Gewebe (MALT).

Die folgenden drei Prozesse, die schematisch in Abbildung 5 dargestellt sind, klären, warum 4-HNE kein Risiko ist:

- (1) Verdünnung: Die höchste Konzentration von 4-HNE gemessen nachdem 180ml menschlichem Bluts der höchsten Ozon-Menge (16 mg) ausgesetzt wurde, ist weniger als 1 mM im Plasma. Während der 20-minütigen intravenösen Infusion wird das Aldehyd sofort in einer totalen Plasma-Extrazellulärflüssigkeitsmenge von etwa 11L verdünnt, was zu einem vorübergehenden Anstieg der Plasmawerte bis zu ca. 0,1  $\mu\text{M}$  führt.
- (2) Entgiftung: Der Stoffwechsel von 4-HNE ist extrem schnell, entweder weil geringe Mengen von Aldehyden mit Milliarden von Zellen, mit mehreren entgiftenden Enzymen wie ALDH, Aldose-Reduktase, und GST interagieren oder wegen der Bildung eines Adduktes mit GSH.<sup>36, 37, 98-100</sup> Mehrere Autoren<sup>96, 101, 102</sup> haben eine metabolische Rate festgestellt, die so hoch ist, dass sie zu dem Schluss kommen, dass 4-HNE sich sogar bei sehr hohen Lipidperoxidationsraten nicht unbegrenzt ansammeln kann.<sup>89</sup> Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen bei sechs Patienten, als wir eine Halbwertszeit von infundierten TBARS von 4,2+<sub>-</sub>1,7min feststellten.<sup>48, 49</sup> Dazu im Gegenteil, wenn die gleiche Zubereitung in ozonisiertem Plasma in einem zellfreiem Medium inkubiert wurde (bei 37°C, pH 7,3), gingen die TBARS-Werte in den nächsten 9 Stunden kaum zurück.<sup>47</sup>
- (3) Ausscheidung: Teilweise metabolisierte LOP werden nach einer Entgiftung durch die Leber in die Galle und nach renaler Ausscheidung im Urin ausgeschieden. Bei der Ratte wurde 4-HNE im Urin als mercapturisches Säure-Konjugate gefunden.  
35,98,103,104

Unter normalen Bedingungen können wegen der Effizienz dieser Prozesse nur submikromolare Konzentrationen von LOP die Organe wie Knochenmark, endokrine Drüsen erreichen und Bereiche des Hypothalamus - ihrer Blutbarriere beraubt-, wo über eine Vielzahl von Kinasen und auch durch einen möglichen Rezeptor für die F2-Isoprostane, können als ein Signalereignis eines laufenden akuten oxidativen Stresses gewertet werden <sup>105-110</sup> (Abb. 5). Als erste Schlussfolgerung ist klar, dass die Behandlung mit Ozon, entweder im Blut ex vivo oder an einer intramuskulären Stelle, akuten, wenn auch geringen, oxidativen Stress darstellt. Allerdings ist dieses Verfahren nur akzeptabel, wenn das Ozon präzise gegen die antioxidative Kapazität entweder des Blutes oder des Gewebes kalibriert ist, in das injiziert wird. Darüber hinaus darf die Ozondosis die antioxidative Kapazität nie um mehr als 30% mit einem Prozess senken, der zwar nur ein paar Minuten dauert in denen Ozon reagiert, aber seine Botenstoffe hinterlässt und danach selbst verschwindet. Darum wurde der Prozess der Blutozonisierung ex vivo charakterisiert durch die Bildung von ROS und LOP, hauptsächlich tätig in zwei Phasen. Unter ROS ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> der erste Botenstoff, der steigt und innerhalb einer Minute im Plasma verschwindet, während LOP während der Retransfusion in den Patienten das Kreislaufsystem erreicht, auf Endothelzellen einwirkt und schließlich die Parenchymzellen erreicht. Ihre Pharmakodynamik minimiert die mögliche Toxizität, das macht LOP zu einem späten und wirksamen Boten.

## B. Die Wirkung von Ozon-„messengers“-boten auf Blutzellen

Zwei Fragen müssen geklärt werden: Erstens, aktiviert Ozon direkt die Zellen? Unser methodischer Ansatz und experimentelle Ergebnisse schließen diese Möglichkeit aus, denn wenn Blut vorsichtig ex vivo mit O<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gemischt wird, löst es sich schnell im Plasmawasser und reagiert dort sofort mit Antioxidantien und mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Blutzellmembranphospholipide, von einer Wolke von Eiweiß-Molekülen umgeben, kommen nicht in Kontakt mit Ozonmolekülen, weil die berechnete Dosis Ozon rasch erschöpft ist (Abb. 4). Diese gefährliche Störung wurde entweder durch eine zu vernachlässigende Hämolyse oder eine Änderung des Hämatokritwerts, oder Austreten von K<sup>+</sup> und Laktat-Dehydrogenase, oder eine Veränderung der osmotischen Fragilität, oder elektrophoretische Mobilität, oder erhöhtes Methemoglobin ausgeschlossen. <sup>47, 54, 65, 111, 112</sup>

Die Werte (mg / dL) für Fibrinogen, Cholesterin, Triglyzeride, HDL und LDL im Plasma ändern sich nicht, auch nicht mit dem Gebrauch der übermäßigen Ozon-Konzentration von 160 µg/mL pro ml Blut. <sup>112</sup> Ebenso wichtig ist die Stabilität der Enzyme wie SOD, GSH-Pase, GSH-RD, und G6PDH in den Erythrozyten. <sup>112</sup> Darüber hinaus haben Shinriki et al <sup>65</sup> nach Isolierung der Erythrozytenmembranen, nach Blutozonisierung innerhalb des therapeutischen Bereichs, weder einen Rückgang von αα-Tocopherol noch einen Anstieg von MDA entdeckt.

Es ist bedauerlich, dass in der Vergangenheit andere Autoren <sup>57,68,113-117</sup> berichtet haben, dass Erythrozyten, aus dem Plasma isoliert, nach dreimaligem Waschen mit Kochsalzlösung und Suspension in proteinfreier Kochsalzlösung strukturelle Veränderungen erfahren haben und intensiver Hämolyse unterlagen, wenn sie Ozon ausgesetzt wurden. Diese irre führenden und unphysiologischen Daten haben erheblich dazu beigetragen, die Ozon-Zytotoxizität zu unterstreichen, die offensichtlich durch die Beseitigung von Plasma-Antioxidantien hervorgerufen wurde. <sup>116</sup> Darüber hinaus wurde die kritische protektive Wirkung von Plasma-Antioxidantien in zwei neueren Studien untermauert. <sup>118,119</sup> Diese Ergebnisse wurden besonders deutlich bei mononukleären Blutzellen (BMC), die mit Kochsalzlösung gewaschen wurden, durch einen deutlichen Rückgang in mitochondrialen Funktionen. <sup>118</sup> Unsere Ansätze werden auch durch andere Daten <sup>47,120,121</sup> sowie die jüngsten Ergebnisse (Abb. 6) unterstützt, die nach exzessiver Ozonisierung von Proben des normalen menschlichen Bluts gewonnen

wurden, die entweder in Heparin oder in Natrium-Citrat gesammelt wurden. Interessanterweise waren heparinisierte Proben viel anfälliger gegenüber Ozon, höchst wahrscheinlich wegen der übrigen physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$  Werte: In der Tat, eine weitere Zugabe von 2,5 - 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  verbesserte die Hämolyse bis zu 40%.

Zweitens, wie aktivieren Ozon-„messengers“ –(boten) Blutzellen? Zunächst führt die plötzliche Bildung eines Gradienten von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zwischen dem ozonisierten Plasma und der intrazellulären Flüssigkeit zu einem raschen Durchfluss von rund 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in das Blutzellenzytoplasma und bildet damit den auslösenden Reiz : je nach Zelltyp, können verschiedene biochemische Stoffwechselwege gleichzeitig in den Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten aktiviert werden, was zu zahlreichen biologischen Wirkungen führt. Die rasche Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Wasser wird durch die hohe Konzentration der intrazellulären GSH, CAT, und GSPase durchgeführt, aber dennoch muss  $\text{H}_2\text{O}_2$  über der Schwellenwertkonzentration liegen, um mehrere biochemische Stoffwechselwege - wie folgt - zu aktivieren.

Die Masse der Erythrozyten säubert den Großteil des  $\text{H}_2\text{O}_2$  : GSH wird umgehend zu GSSG oxidiert und die Zelle, extrem empfindlich hinsichtlich der Verringerung des GSH/GSSG-Verhältnisses, korrigiert sofort die Unwucht, entweder durch austreiben von GSSG oder indem sie es mit GSH-Rd auf Kosten von Ascorbat oder des reduzierten NADPH reduziert, die als entscheidende Elektronenspenden dienen.

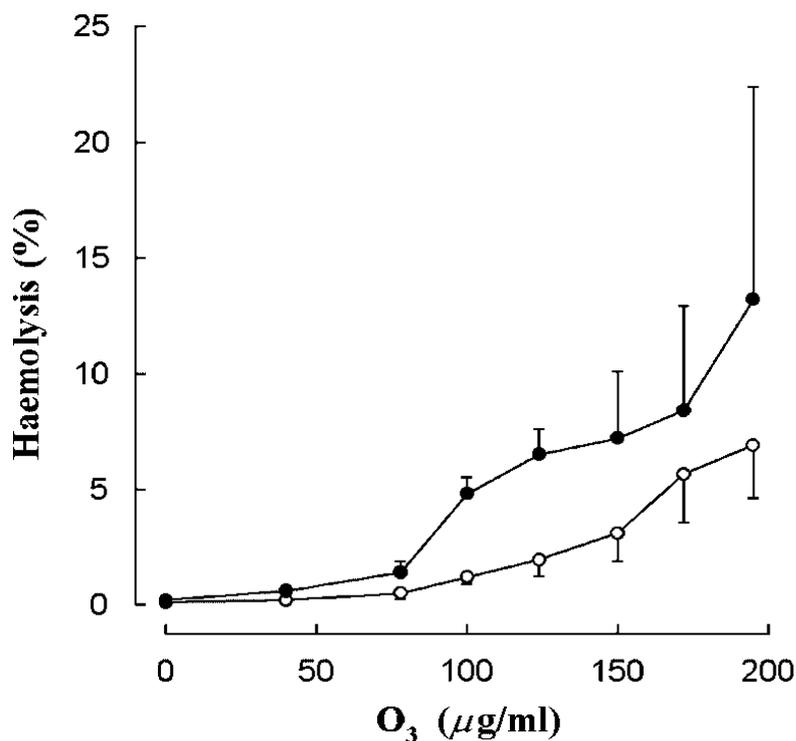


Abbildung 6: Kinetik der Hämolyse in Bezug auf die Ozonkonzentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$  per mL Blut). Blut von fünf Spendern wurde mit CPD behandelt (o) oder mit 30 U/ml Heparin (gefüllter Kreis) (Mittelwert  $\pm$  SD). (Bocci V. What happens in the intracellular environment after blood ozonation? (Was passiert in der intrazellulären Umgebung nach Blutozonisation?) Oxygen--ozone therapy. A critical evaluation, (Sauerstoff - Ozon-Therapie. Eine kritische Auswertung), Kap. 14. Abbildung 43. Kluwer Academic Publishers, 2002. P 123. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science+Business Media, ehemals Kluwer Academic Publishers).

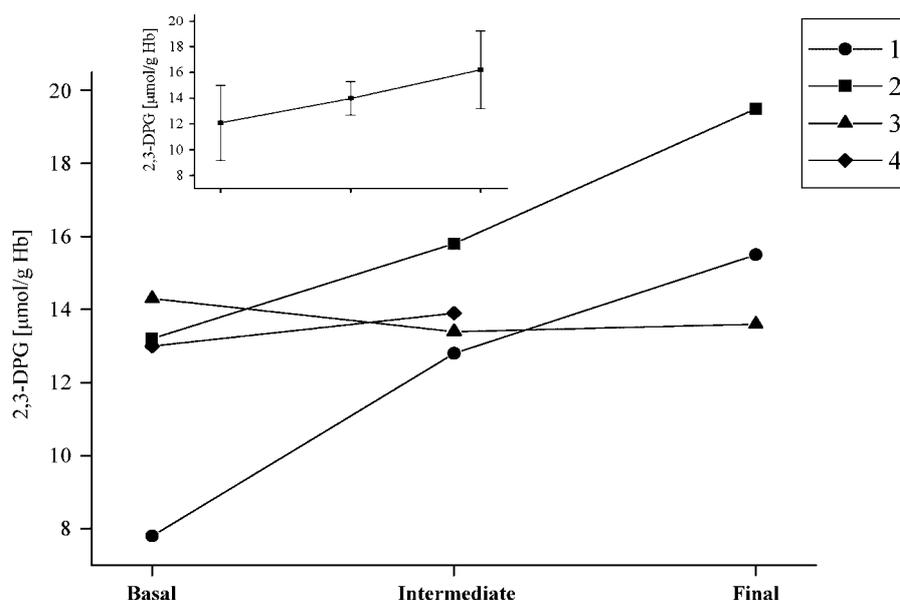
Als nächstes wird die oxidierte NADP, sofort nach der Aktivierung des Pentosephosphatweges, dessen Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) das entscheidende Enzym ist, reduziert. Bei Patienten mit ARMD wurde nach 13  $\text{O}_3$ -AHT ein geringer Anstieg der ATP-Bildung festgestellt, ob dies aber aufgrund der Aktivierung des Pentosezyklus oder einer Erhöhung der Phosphofruktokinase-Aktivität oder auf beides

zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden. Die reinfundierten Erythrozyten verbessern, aufgrund einer Verschiebung der Sauerstoff-Hämoglobin-Dissoziationskurve nach rechts, für eine kurze Zeit die Lieferung von Sauerstoff in das ischämische Gewebe, entweder wegen einer leichten Abnahme des intrazellulären pH-Werts (Bohr-Effekt) oder/und einer Erhöhung des 2,3-Diphosphoglycerat-(2,3-DPG)-Wertes, wie in Abbildung 7 gezeigt (unveröffentlichte Daten). Offensichtlich hat eine Zunahme dieses Metaboliten eine große Bedeutung, weil es die Verschiebung des oxigenierten Hämoglobins nach rechts - und dadurch eine Steigerung der Sauerstoffversorgung an das hypoxische Gewebe - verstärkt. Allerdings zeigt Abbildung 7, dass der Anstieg nur bei drei Patienten festgestellt wurde, bei denen die anfänglichen Werte eher gering waren. Daher muss diese Beobachtung an einer großen Zahl von Patienten erforscht werden, und es wird auch notwendig sein, die Aktivierung von 2,3-Bisphosphoglycerat-Mutase zu klären.

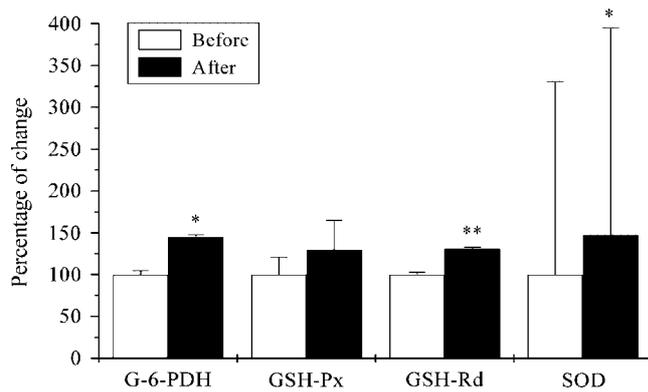
Unnötig zu erwähnen, dass eine einzige autohämotherapeutische Behandlung nur einen minimalen Einfluss hat, und dass wir mindestens 3-4 L Blut (~20 Behandlungen) innerhalb eines Zeitraums von 30-60 Tagen ozonisieren müssen.

In einer weiteren kleinen Gruppe von fünf ARMD-Patienten wurde nach 15-17 O<sub>3</sub>-AHT ein Anstieg bei einigen antioxidativen Enzymen festgestellt (Abb. 8). Dieses Ergebnis wurde auch von anderen Autoren berichtet<sup>122,123</sup> und es ist wahrscheinlich, dass LOP als wiederholte Reize auf das Endothel und das Knochenmark handeln und die Anpassung an die Ozon-stress (Belastung) während der Erythrogenese verursachen. Ob die enzymatischen Werte für mehrere Monate während der Erhaltungstherapie erhalten bleiben, muss evaluiert werden.

Eine weitere relevante Erkenntnis war, dass bei vier Patienten mit ARMD nach einem Zyklus von 13 O<sub>3</sub>-AHT Behandlungen (bei denen innerhalb von 7 Wochen etwa 3,8 L Blut ozonisiert wurden), - bei der die isopyknische Zentrifugation des Blutes alte (schwere) und junge (leichte) Erythrozyten (RBC) trennte -, im sich Laufe der Ozontherapie (Tabelle I) einen deutlichen Anstieg der G6PDH an dem jungen Erythrozyten-Anteil zeigte. Ob die enzymatischen Werte über die Zeit erhalten bleiben, muss evaluiert werden. Die G6PDH Wirkung, ausgedrückt in nmol / h / mg Hämoglobin, betrug vor und nach der Ozon-Therapie in der Gesamtzahl der roten Blutkörperchen entweder 357±91 bzw. 406±40.



**Abbildung 7.** 2,3-DPG-Wertveränderungen bei vier Patienten, durchgeführt vor der Behandlung („Basal“), nach 6 bis 7 Behandlungen („Intermediate“), und am Ende der Behandlung („Final“). Der Einschub zeigt die statistische Verteilung (Mittelwert ± SD) der Daten (unveröffentlichte Ergebnisse)



**Abb. 8:** Anstieg der antioxidanten Enzyme bei ARMD-Patienten nach 20 – 24 O<sub>3</sub>-AHTs innerhalb von 7 - 8 Wochen (n=10, Mittelwert ± SD, , unveröffentlichte Ergebnisse)

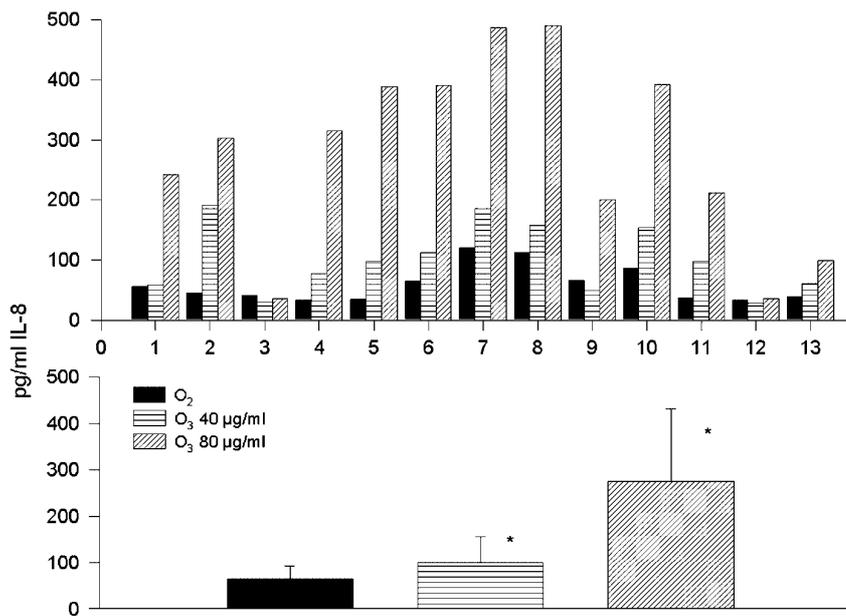
**Tabelle I:** Auswertung der G6PDH-Aktivität in der Gesamtheit der jungen und alten roten Blutkörperchen (RBC) in Blutproben von vier Patienten mit altersbedingter Makula-Degeneration vor und nach einer Ozontherapie, Zyklus von 13 Behandlungen (unveröffentlichte Ergebnisse)

G6PDH-Aktivität <sup>a</sup>			
	<u>GesamtRBC</u>	<u>Junge RBC</u>	<u>alte RBC</u>
Vor der Behandlung (n=4)	356,8±90,7	550,3±157,5	310,7±127,3
Nach der Behandlung (n=4)	406,2±40,4	784,2±181,9	438,8±86,7

<sup>a</sup>G6PDH-Aktivität, ausgedrückt als nmol/hr/mg Hämoglobin in der gesamten Erythrozytenpopulation und bei jungen und alten Fraktionen vor und nach 13 O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>-Behandlungen. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte ± SD Wert.

Während die enzymatische Erhöhung der gesamten Erythrozytenpopulation verständlicherweise gering war, wurde sie im Vergleich vom Zustand vor und nach der Ozontherapie bei sehr jungen (leichten) Erythrozyten deutlich verstärkt von 550+157 auf 748+182 vorgefunden. Bei den so genannten alten Erythrozyten (20-120 Tage alt), zu denen praktisch der größte Teil der Zellen gehört, erhöhte sich G6PDH offenbar nur von 310± 127 bis 435± 87 nmol/h/mgHb. Es ist nötig zu erwähnen, dass der Anteil sowohl der jungen wie auch der alten Erythrozyten während der Behandlungen praktisch konstant blieb (unveröffentlichte Daten). Als Folge zeigte ein Patienten mit chronischer Ischämie der Gliedmaßen (Phase II), der sich einer Ozon-Therapie unterzog, eine klinische Verbesserung durch die Bildung ständig nachfolgender Kohorten von Erythrozyten, die zunehmend besser in der Lage waren, Sauerstoff zu seinem ischämischen Gewebe zu liefern.

Obwohl Ozon eines der stärksten Desinfektionsmittel ist, hat sich gezeigt,<sup>124,125</sup> dass Ozon Bakterien, Viren und Pilze in vivo nicht inaktivieren kann, weil paradoxerweise die pathogenen Erreger gut geschützt sind, insbesondere durch das starke antioxidative System in den Zellen. So wurde die positive Wirkung der Ozon-Therapie bei einigen Infektionskrankheiten als milder Verbesserer des Immunsystems interpretiert, hervorgerufen durch die Aktivierung von Neutrophilen und der Stimulierung der Synthese einiger Zytokine.<sup>64,76,77,79,86,126,127</sup> Erneut ist der entscheidende Botenstoff H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, der nach Eindringen in das Zytoplasma der BMC, durch Oxidation von ausgewählten Cysteinen, eine Tyrosin-Kinase aktiviert, die in der Lage ist, den Transkriptionsfaktor NF-κB zu phosphorylieren. Die Freisetzung eines Heterodimers über Effektor-Gene bewirkt die Synthese mehrerer Proteine, darunter die Akut-Phasen-Reaktanten, Adhäsionsmoleküle und zahlreiche proinflammatorische Zytokine. Dieser vorübergehende, empfindliche Prozess wird gesteuert durch eine Phosphatase oder durch zytoplasmatische Antioxidantien gehemmt.



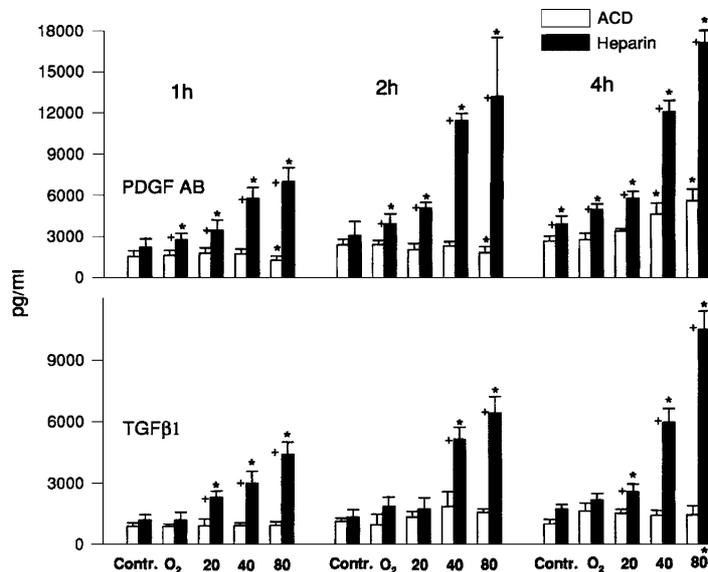
**Abbildung 9:** Effekt von 1 min Exposition entweder von O<sub>2</sub> oder O<sub>3</sub> (40 und 80 µg/mL) auf die Produktion von IL-8 nach 8 h Inkubation von 13 Blutproben. Die durchschnittlichen Werte sind im unteren Bereich nach Abzug der Kontrollwerte angegeben. \*Signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zu Proben, die mit O<sub>2</sub> behandelt wurden. Die variable Produktion von IL-8 unter den Spendern ist bemerkenswert, vor allem das Fehlen der Produktion bei den Spendern 3 und 12, wahrscheinlich zurückzuführen auf einen hohen TAS-Wert. (Bocci V., Was passiert in der intrazellulären Umgebung nach Blutozonisierung? Sauerstoff-Ozon-Therapie. Eine kritische Beurteilung, Kap.14. Abbildung 53. Kluwer Academic Publishers, 2002. P 134. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science Business Media, ehemals Kluwer Academic Publishers).

Die Freisetzung von verschiedenen Zytokinen aus ozonisiertem Blut nach In-vitro-Inkubation wurde seit 1990 gemessen.<sup>128</sup> Sobald die ozonisierten Leukozyten wieder in den Kreislauf zurückkehren, lassen sie sich in lymphatischen Mikroumgebungen nieder und setzen sukzessive Zytokine frei, die auf parakrine Weise auf die benachbarten Zellen einwirken, mit der Möglichkeit einer Reaktivierung des niedergedrückten Immunsystems. Dieser Prozess, beschrieben als physiologische Cytokinreaktion,<sup>129</sup> ist Teil des angeborenen Immunsystems und hilft uns, in einer feindlichen Umwelt zu überleben. Eines unserer interessantesten Ergebnisse bestand in der Beobachtung der variablen individuellen Produktion von IL-8 bei Blut von 13 ozonisierten Proben.<sup>130</sup> Abbildung 9 zeigt, dass die unterschiedliche Freisetzung von IL-8 durch mittlere und hohe Ozonkonzentrationen die Anwesenheit von hohen, mittleren und keinen (orig.: responders?) Antworten anzeigt. Das Ergebnis wurde als Folge genetischer Faktoren und unterschiedlicher Plasma-Antioxidantien interpretiert.

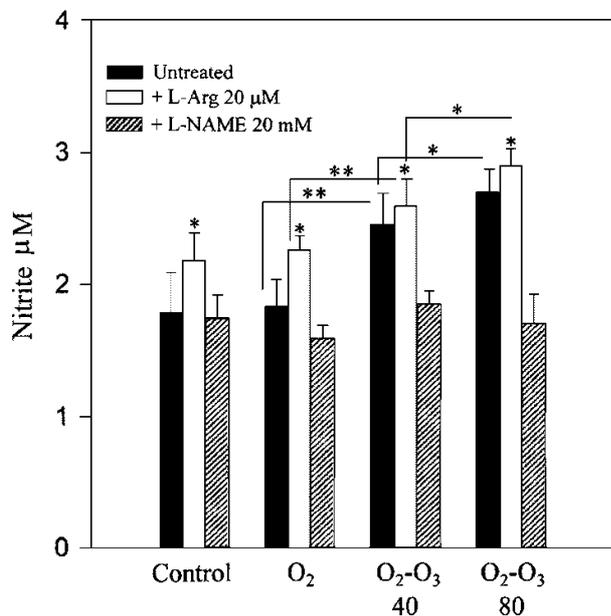
Während der Ozonisierung von Blut, vor allem wenn es mit Heparin antikoaguliert wird, wurde eine ozondosenabhängige Zunahme der Aktivierung von Thrombozyten festgestellt,<sup>131,132</sup> mit einer daraus resultierenden Freisetzung von typischen Wachstumsfaktoren, die die Heilung von chronischen Geschwüren bei ischämischen Patienten verbessern wird (Abb. 10). Wann immer möglich ist, wenn auch mit Vorsicht, die Verwendung von Heparin dem Natriumcitrat als Anticoagulans vorzuziehen, denn weil plasmatisches Ca<sup>2+</sup> nicht chelatiert wird, werden die biochemischen und elektrischen Ereignisse verstärkt.

Während der Reinfusion des ozonisierten Blutes in den Patienten wird schließlich die große Weitung der Endothelzellen durch Albumin-LOP aktiviert, was zu einer erhöhten Produktion von NO, Plasma-S-Nitrosothiol und S-Nitrosohemoglobin führt.<sup>133-136</sup> Abbildung 11 zeigt die In-vitro-Produktion von Nitrit durch menschliche vaskuläre Endothelzellen nach der Zugabe von menschlichem ozonisiertem Serum. Die Produktion von NO wurde deutlich durch die

Zugabe von L-Arginin verbessert (20  $\mu\text{M}$ ) und wurde durch  $\text{O}_3$  potenziert, während es in Gegenwart des NO-Inhibitors N- $\omega$ -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) gehemmt wurde.



**Abbildung 10:** Freigabe von Faktoren menschlicher Thrombozyten bei 1, 2 und 4 Stunden Inkubation. Die gleichen entweder in Heparin oder ACD gesammelten PRP-Proben waren  $\text{O}_2$  oder  $\text{O}_2\text{--O}_3$  (Konzentrationen von 20, 40 und 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) vor der Inkubation für 30 Sekunden nicht ausgesetzt (zur Kontrolle) bzw. ausgesetzt. Die statistische Signifikanz wird gekennzeichnet durch das Symbol (\*) für interfraktionelle Analyse und (+) für intrafraktionelle Analyse. (Bocci V., What happens in the intracellular environment after blood ozonation? Oxygen-ozone therapy. A critical evaluation, chap.14. Figure 65 (Was passiert in der intrazellulären Umgebung nach Blutbehandlung mit Ozon? Sauerstoff-Ozontherapie. Eine kritische Evaluation, Kap. 14, Abbildung 65. Kluwer Academic Publishers, 2002. P 158. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science + Business Media, ehemals Kluwer Academic Publishers).



**Abbildung 11.** Produktion von Nitrit durch HUVECs, gemessen nach 24 Stunden Inkubationszeit, nach Zugabe von normalem menschlichem Serum, entweder sauerstoff- oder ozonangereichert (mit 40 und 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Auswirkungen der Zugabe von L-Arginin und L-NAME. Die Daten werden als Mittelwert + SD von sechs verschiedenen Experimenten vorgestellt. (Bocci V. What happens in the intracellular environment after blood ozonation? Oxygen-ozone therapy. A critical evaluation (Was passiert in der intrazellulären Umgebung nach Blut-Ozonisierung? Sauerstoff-Ozon-Therapie. Eine kritische Beurteilung), Kap.14. Abbildung 68. Kluwer Academic Publishers, 2002, P 165. Mit freundlicher Genehmigung von Springer Science Business Media, ehemals Kluwer Academic Publishers).

Während NO eine Halbwertszeit von weniger als 1 sec hat, kann proteingebundenes NO die Vasodilatation auch an entfernten Standorten mit ischämischen Gefäßerkrankungen relevante therapeutische Wirkung entfalten. Es bestehen wenige Zweifel, dass der therapeutische Vorteil, beobachtet bei vielen Patienten mit obstruktiver peripherer arterieller Verschlusskrankheit (POAD), durch mehrere Faktoren, wie eine erhöhte Freisetzung von Sauerstoff durch die Vasodilatation, durch Spuren von NO und CO und eine erhöhte Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren aus Blutplättchen bewirkt wird. Alle diese Daten unterstreichen, dass submikromolare LOP-Werte stimulierend und vorteilhaft wirken können<sup>137</sup>, während gesichert ist, dass mikromolare Werte toxisch sein können.<sup>89</sup>

Diese Schlussfolgerung verstärkt den Ansatz, dass optimale Ozonkonzentrationen für die Verwirklichung eines therapeutischen Erfolges von entscheidender Bedeutung sind: **zu niedrige Konzentrationen sind praktisch nutzlos (sie lösen allenfalls einen Placebo-Effekt aus)**, während zu hohe Konzentrationen eine negative Wirkung hervorrufen können (Unwohlsein, Müdigkeit), so dass die Konzentrationen knapp über dem Schwellenwert sein müssen, um akuten, absolut vorübergehenden oxidativen Stress auszulösen, der in der Lage ist biologische Wirkungen ohne Toxizität auszulösen. Es besteht kein Zweifel, dass der Prozess der Blutozonisierung präzise mit einer berechneten Ozondosis kontrolliert werden muss: In dieser Dosierung ist es nicht schädlich und wirklich in der Lage eine Vielzahl von nützlichen biologischen Reaktionen auszulösen und eventuell auch die Umkehrung eines chronischen oxidativen Stresses aufgrund von Alterung, chronischen Infektionen und verschiedenen Krankheiten innerhalb des metabolischen Syndroms zu bewirken. In der Tat wurde die ozontherapeutische Behandlung als sicherer „therapeutischer Schock“ gedeutet, der in der Lage ist, die Homöostase wieder herzustellen.<sup>138</sup>

**Diese Aspekte sind kritisch und implizieren zwei Nachteile:**

**erstens, wenn der Ozongenerator nicht gut kalibriert ist oder in regelmäßigen Abständen überprüft wird, kann er falsche und gefährliche Ozonmengen abgeben, und zweitens, wenn der Ozontherapeut den Ozonisierungsprozess nicht in vollem Umfang versteht, so kann er einige Fehler machen und den Ansatz gefährden.**

Weitere Aspekte in Bezug auf die Zukunft der Ozontherapie werden in Abschnitt 9 betrachtet.

## **5. IST OZON IN DER LAGE, EINE ANPASSUNG AN DEN CHRONISCHEN OXIDATIVEN STRESS HERBEI ZU FÜHREN?**

Dass Ozon, eines der stärksten Oxidationsmittel, eine antioxidative Reaktion herbeiführen kann, die in der Lage ist, einen chronischen oxidativen Stress umzukehren, scheint auf den ersten Blick ein paradoxes Konzept zu sein. Allerdings kommt dieses Konzept in der Tier- und Pflanzenwelt verbreitet vor.<sup>147-150</sup> Jede Veränderung der äußeren oder inneren Umwelt stört die Zellhomöostase, aber wenn der Stress erträglich ist, oder sorgfältig in seiner Intensität austariert wird, kann sich die Zelle oder der Organismus anpassen und überleben. Wenn er aber zu hoch ist, oder die Zelle bereits geschädigt ist, programmiert die Zelle ihren eigenen Tod. Zu den Stresszuständen gehören Hyperthermie, Hyperoxie, Ischämie, Hypoglykämie, pH-Veränderungen, Strahlung, sehr wahrscheinlich auch psychische und hormonelle Störungen sowie chronische Infektionen, die eine exzessive ROS- und LOP- Produktion bedeuten. Offensichtlich muss Ozon mit einbezogen werden, aber das Phänomen der Ozontoleranz ist mittlerweile gut bekannt. Das Konzept der „ischämischen Präkonditionierung“ des Herzens, das nach einem kurzen nicht tödlichen Zeitraum von Ischämie für folgende ischämische Beeinträchtigungen resistent gegen Infarkt werden kann, wurde von Murry et al. als ersten erforscht<sup>151</sup>

“Oxidative Prækonditionierung“ wurde ebenfalls gut demonstriert.<sup>152-157</sup> Daher ist es von Interesse, dass kleine Mengen von ROS und LOP die Erhöhung der Regulation der antioxidativen Enzyme auf der Grundlage des Phänomens hervorrufen, das unter dem Begriff der „hormesis“<sup>158-162</sup> beschrieben wurde. Auf der Grundlage dieses Phänomens, das besagt „Die Exponierung eines Organismus, auf einem niedrigen Niveau eines Agenten, der auf einem hohen Niveau schädlich ist, induziert eine adaptive und nützliche Reaktion“<sup>159,160,163</sup>, wurde postuliert, dass LOP, indem es als Fernbote agiert, allen Organen die Informationen eines akuten oxidativen Stresses überbringen kann.<sup>54</sup> Das Knochenmark ist besonders relevant, da es antioxidative Enzyme während der Erythrogenese hochregulieren kann und die Stammzellen zur möglichen Regeneration eines Infarktes freigeben kann. Die oxidative Vorkonditionierung oder, wie wir lieber sagen, die Anpassung an den chronischen oxidativen Stress, wurde nun experimentell nachgewiesen.<sup>40, 45, 48</sup>

Die erhöhte Synthese von Enzymen wie SOD, GSPase, GSH-Rd und CAT wurde wiederholt bei Versuchstieren und bei Patienten ermittelt (bei 57 überprüft). Iles und Liu<sup>164</sup> haben gezeigt, dass die 4-HNE, indem sie die  $\gamma$ -Glutamat-Cystein-Ligase induziert, einen Anstieg der intrazellulären GSH verursacht, das eine Schlüsselrolle bei der antioxidativen Verteidigung spielt. Darüber hinaus induziert LOP oxidative Stress-Proteine, von denen eins Hämooxygenase I (HO-1-oder HSP-32) ist, das, nach Abbau des Häm-Moleküls, sehr nützliche Verbindungen wie CO und Bilirubin liefert.<sup>165-171</sup> Bilirubin ist ein bedeutendes lipophiles Antioxidans und Spuren von CO kooperieren mit NO bei der Regulierung der Vasodilatation durch Aktivierung von zyklischem GMP. Fe<sup>2+</sup> wird unverzüglich durch die erhöhte Synthese von Ferritin chelatiert.<sup>172</sup> Die Induktion von HO-1 nach oxidativem Stress wurde in Tausenden von Veröffentlichungen als eines der wichtigsten antioxidativen Verteidiger und schützendes Enzym beschrieben.

Beides, milde Ozoninhalation und ozonisiertes Plasma, induziert HSP-70.<sup>170, 173</sup> Wenn Ozon zweckmäßigerweise in kleinen Dosen verwendet wird, kann es ein nützlicher Wirkstoff sein, der in der Lage ist, einen sonst irreversiblen Zustand des oxidativen Stresses zu korrigieren. Es gibt ernsthafte Erkrankungen wie chronische Infektionen, neurodegenerative und Autoimmunkrankheiten, bei denen ein zu hohes Ungleichgewicht- zwischen einer Überproduktion von Oxidantien und erschöpfter antioxidativer Abwehr herrscht- und zum Tode führt. Wie die moderne Medizin dieses Ungleichgewicht korrigiert? Über mehrere therapeutische Ansätze ist häufig berichtet worden, darunter solche unter Anwendung von Antioxidantien mit der Zugabe von N-Acetylcystein,<sup>174-176</sup> aber sie sind nur teilweise erfolgreich.

Die Ozonbehandlung wird heute als ein vorübergehender und miniaturisierter oxidativer Stress betrachtet, was in einer Art therapeutischen Schock für den kranken Organismus resultiert. Ozon als “ Prodrug“ Initialwirkstoff, erkennt diesen Schock, da es eine Reihe von Botenstoffen generiert, die in der Lage sind, alle Zellen im Organismus zu erreichen (Abb. 5).

Submikromolare Mengen der LOP fungieren als Schlüsselmediatoren und können in noch reagierenden Zellen eine Folge von biochemischen Mechanismen aktivieren, die in der Lage sind, die Gene zu reaktivieren, was zu einer erneuten Synthese von HSP und antioxidativen Enzymen führt. Wenn die Krankheit zu weit fortgeschritten ist, werden die Zellen anergisch und sind nicht mehr in der Lage, auf die Behandlung zu reagieren. In der Tat haben wir beobachtet, dass sich der Zustand von präterminalen Krebspatienten nach intensiver Chemotherapie bei einer Ozontherapie nicht bessert. Das ist auch der Grund, warum wir immer mit geringer Ozonkonzentrationen gerade oberhalb der Schwelle beginnen, um zu einer besseren Oztoleranz zu kommen, in Übereinstimmung mit dem alten Konzept „Start low - go slow“ – „Fange unten an – gehe langsam voran“. Darüber hinaus kann die

Stimulation des endokrinen und des zentralen Nervensystems helfen zu verstehen, warum die meisten der reagierenden Patienten während längerer Ozontherapie von einem Gefühl der Euphorie und Wellness berichten, -wahrscheinlich aufgrund eines verbesserten Stoffwechsels sowie eines verstärkten Ausstoßes von Hormonen oder Neurotransmittern.

## 6. WELCHES SIND DIE WEGE DER OZONVERABREICHUNG?

Tabelle II zeigt, dass Ozon mit großer Flexibilität verabreicht werden kann, aber es darf wegen der Gefahr eine Sauerstoffembolie zu provozieren niemals intravenös als Gas injiziert werden, angesichts der Tatsache, dass das Gasgemisch nie weniger als 95% Sauerstoff enthält. Der zuverlässigste Ansatz war bisher die O<sub>3</sub>-AHT, weil auf der Grundlage des Patientengewichts, einem vorgegebenen Volumen des Blutes (200-250 mL), dem man entweder Natriumcitrat 3,8% (1+9ml Blut) oder Heparin (20IU/mL Blut) hinzugefügt hat, ein gleiches Volumen von Gas (O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>) auf stöchiometrische Weise zugesetzt wird. Die Ozonkonzentration, unter Verwendung einer ozonbeständigen Einweg-500-ml-Vakuum-Glasflasche, wird präzise bestimmt. Diese einfache, preiswerte Prozedur (alles notwendige Einwegmaterial kostet zusammen ca. 12 US\$) hat bereits therapeutische Ergebnisse auch bei Gefäßerkrankungen erbracht, die denen der konventionellen Medizin überlegen sind (behandelt in Abschnitt 7A).

**Tabelle II.** Wege für die Ozonanwendung

Parenteral	Topisch oder Lokal/ Regional
Intra-arteriell (IA) <sup>a</sup>	
Intramuskulär (IM)	Nasal <sup>b</sup>
Subcutan (SC)	Tubal <sup>b</sup>
Intraperitoneal (Ipe)	Auricular
Intrapleural (IPL)	Oral <sup>b</sup>
Intra-articular (IPL)	Vaginal
Periarticular (a)	Urethral und in die Blase
Myofascial (b)	Rectal
Intradiscal (ID)	Cutaneous
Intraforaminal (IF)	Dental Intraläsional
Intraläsional (Iles) (c)	

<sup>a</sup> Nicht mehr für die Extremitätenischämie verwendet. Lebermetastasen könnten über die Leberarterie embolisiert werden.

<sup>b</sup> 30-40 Sek. Während Apnoe durchführen

<sup>c</sup> Intratumoral oder über eine Fistel.

Außerdem wurden die therapeutischen Modalitäten, die bisher hauptsächlich auf AHT und auf die empirische und ungenaue rektale Insufflation von Gas eingeschränkt waren,<sup>139,177,178</sup> erweitert: Sie schließen die Quasi-Ganzkörper-Exposition<sup>140,179</sup> und die extrakorporale Blutanreicherung mit O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> ein.<sup>141</sup> Das letztgenannte Verfahren ist eher invasiv, weil das Blut, das aus der Vene gewonnen wurde, durch einen ozonbeständigen Gastauscher zirkuliert<sup>180,181</sup> und mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe dem Kreislauf über eine kontralaterale Vene wieder zugeführt wird. Andererseits braucht die kutane Exposition gegenüber Sauerstoff-Ozon teilweise keine Punktion und erlaubt durch die große Fläche der Haut eine allgemeine und wohltuende Wirkung. Klar ist, dass wir heute die am besten geeignete Methode für verschiedene Erkrankungen, ihren Stand und die Verfassung des Patienten wählen können. Eine eigene Diskussion muss für die kleine AHT geführt werden, die im Wesentlichen aus der Abnahme von 5 ml Blut besteht, das sofort und intensiv für 1 min mit einer gleichen Menge von O<sub>2</sub>- O<sub>3</sub> bei einer Ozonkonzentration zwischen 80 und 100 µg/ml Gas pro ml Blut gemischt wird, was bereits ausführlich beschrieben wurde.<sup>142</sup> Das leicht oxidierte Blut, einschließlich des Schaums, wird sofort und ohne Narkose in den

Gluteusmuskel injiziert. Als unspezifischer immunmodulatorischer Ansatz wurde dies bisher allgemein in den letzten zwei Jahrzehnten für die erfolgreiche Behandlung von Herpesinfektionen eingesetzt.<sup>143</sup>

Die leichte Hämolyse (~ 2%) ist erforderlich, weil die in den Gesäßmuskel gegebene Hämie die Synthese von HO-1 stimuliert.<sup>165, 171</sup>

## **7. WELCHE KRANKHEITEN WERDEN ANGEMESSEN MIT OZONTHERAPIE BEHANDELT?**

Auf der Grundlage der Wirkmechanismen kann die Ozontherapie folgende biologische Reaktionen auslösen: (a) Sie verbessert die Durchblutung und Sauerstoffversorgung ischämischen Gewebes durch die aufeinander abgestimmten Wirkungen von NO und CO und eine Erhöhung der intraerythrozytischen 2,3-DPG-Werte, (b) durch die Verbesserung der Sauerstoffversorgung verbessert sie den allgemeinen Stoffwechsel, (c) sie reguliert die zellulären antioxidativen Enzyme nach oben und induziert HO-1 und HSP-70; (d) sie führt zu einer leichten Aktivierung des Immunsystems und steigert die Freisetzung von Wachstumsfaktoren; (e) sie verfügt über eine hervorragende desinfizierende Wirkung, wenn sie äußerlich angewendet wird ( z.B.Beutelbegasung ), während dies wegen der antioxidanten Kapazitäten des Bluts im Kreislauf vernachlässigbar ist; (f) sie führt nicht zu akuten oder späteren Nebenwirkungen;<sup>182</sup> (g) Sie führt zu einem überraschenden Wohlbefinden, wahrscheinlich durch die Stimulierung des neuro-endokrinen Systems. Es scheint wirklich so, dass Ozon, weil es viele Ziele hat, indirekt bei der Wiederherstellung verloren gegangener funktionaler Aktivitäten bei chronischen Erkrankungen helfen kann. Wenn diese Interpretation korrekt ist, wirkt die Ozontherapie wie ein biologischer Responsemodifizierer. (engl.:Ozone acts as a biological response modifier. )

Obwohl die Ozontherapie jetzt in vielen Ländern verwendet wird, wird sie vor allem durch private Ärzte angewandt und die Leistung der großen klinischen Studien wurde stark durch den Mangel an Sponsoren, Desinteresse der Pharma- sowie Gesundheitsbehörden, und Vorurteile durch klinische Wissenschaftler behindert.

Es wurden jedoch eine Reihe von Studien mit den folgenden Ergebnissen durchgeführt:

### **A. Periphere obstruktive arterielle Erkrankungen**

Selbst eine geringfügige Behinderung der Extremitäten-Arterien durch Arteriosklerose, Diabetes oder Buerger's Krankheit (Thrombangitis obliterans) führt zu einer allmählichen Verringerung des Blutflusses zu den Füßen. Gewebeischämie und jedwede geringfügige Verletzung erleichtern die Bildung eines Geschwürs, das nicht heilen will, weil Sauerstoff, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren fehlen, die unerlässlich für den Heilungsprozess sind. Diese Pathologie ist die am besten geeignete, um mit O<sub>3</sub>-AHT behandelt zu werden. Nach Fontaine-Leriches Einstufung erzielen Patienten des Stadiums II (Claudicatio intermittens und vorübergehende Schmerzen) oder im Stadium III (anhaltende Schmerzen, Zyanose, und möglicherweise Anfänge von Geschwüren) die besten Ergebnisse. Stufe IV schließt beginnende Nekrose der Zehen und unerträgliche Schmerzen ein, die zur chirurgischen Amputation führen, die allerdings mit O<sub>3</sub>-AHT in etwa 50% der Fälle vermieden werden kann.<sup>183-185</sup> Im Vergleich zu Pentoxifyllin und Prostanoiden (der Goldstandard der orthodoxen Behandlung), hat sich O<sub>3</sub>-AHT als effizienter und ohne Nebenwirkungen bei ischämischen Gefäßerkrankungen erwiesen. In einer kleinen Studie wurden 28 Patienten randomisiert, um entweder ihr eigenes ozonisiertes Blut oder eine intravenöse Infusion von Prostacyclin zu erhalten.<sup>186</sup> Alle Patienten erhielten weiterhin eine konventionelle Behandlung

mit Statinen, Antihypertensiven und Anti-Thrombozyten-Aggregation. Die Ozontherapie erwies sich als wirksamer als Prostacyclin in Bezug auf die Schmerzlinderung und Verbesserung der Lebensqualität. Es gab aber in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied bei der Durchblutung der unteren Gliedmaßen, wahrscheinlich wegen der kurzen Dauer der Behandlung (14 Behandlungen in 7 Wochen). Ausgedehntere Behandlungen führen zu einer zufriedenstellenden Heilung von Geschwüren.<sup>187</sup> Frühere Studien<sup>122,188-194</sup> haben die Validität der O<sub>3</sub>-AHT in dieser komplexen Pathologie gezeigt, aber es ist ein Fehler, die Therapie bei diesen Patienten zu früh zu beenden, da O<sub>3</sub>-AHT, wie andere herkömmliche Medikamente lebenslang fortgesetzt werden muss, wenn auch weniger häufig.

Ein verbessertes Behandlungsschema in einer laufenden Studie besteht aus zwei O<sub>3</sub>-AHT (225ml Blut plus 25ml 3,8% Natrium-Citrat-Lösung), die einmal wöchentlich über mindestens 4 Monate gegeben wird.

Die topische Therapie, durchgeführt mit ozonisiertem Olivenöl, ist äußerst nützlich, wenn erste trockene „Verbrennungen“ oder Geschwüre vorhanden sind. Die Häufigkeit der O<sub>3</sub>-AHT hängt von dem Stadium der Krankheit ab und bezüglich der Stadien III und IV kann sie bei dem Versuch, eine Amputation zu verhindern, täglich durchgeführt werden. Wie gut die O<sub>3</sub>-AHT funktioniert wird offensichtlich durch die Tatsache, dass die nächtlichen quälenden Schmerzen nach den ersten zwei bis drei Behandlungen verschwinden, wobei sie die Verbesserung des Blutflusses im ischämischen Gewebe und beim minderdurchbluteten Muskel anzeigen.

Im Januar 2008 veröffentlichte Lancet eine doppelt blinde, placebokontrollierte Studie (ACCLAIM trial) bei 2426 Patienten mit Funktionsklassen II-IV chronischer Herzinsuffizienz (CHF) der New York Heart Association (NYHA)<sup>195</sup> Neben einer Standardmedikation unterzog sich die experimentelle Gruppe während eines Zeitraums von etwa 24 Wochen ca. 25 Intraglutealinjektionen, wobei jeder Patient 10 ml des eigenen Blutes, stark ozonisiert mit UV-bestrahltem Ozon und erhitzt auf 42,5°C, erhielt. Es ist unglaublich, dass 10 ml Blut mit nicht weniger als **75 mg Ozon** oxidiert wurden, eine Dosis, die alle Zellen tötet und Plasma-Proteine denaturiert. Dieses Verfahren, das eine Art von kleiner O<sub>3</sub>-AHT darstellt,<sup>196</sup> wurde mit dem Ziel erfunden, immunsuppressive Verbindungen zu erzeugen, die in der Lage sind, den pathophysiologischen Mechanismen, die für das Fortschreiten von CHF verantwortlich sind, entgegenzuwirken. Die Ergebnisse waren enttäuschend, da kein Unterschied in dem kombinierten Endpunkt des Todes aus kardiovaskulären Gründen zwischen der Kontrollgruppe und der experimentellen Gruppe festgestellt wurde. Einige Forscher<sup>197-200</sup> haben diesen Ansatz kritisiert, der auch zum Fehlschlag bei der früheren Simpadicostudie bei Patienten mit chronischer Gliedmaßenischämie führte.<sup>201</sup> Tatsächlich wurde diese Studie wegen der Gefahr Tumore zu erzeugen gestoppt.

Dieser Ansatz wurde hier erörtert, da – wenn man auf einem irrationalen Konzept aufbaut – dies den Fortschritt der wirklichen O<sub>3</sub>-AHT untergraben kann, die die minimale Menge von Ozon nutzt, die gerade ausreichend für die Auslösung nützlicher biologischer Aktivitäten ist.

Millionen von Menschen leiden unter chronischer Bein-, Hirn- oder Herzischämie, welche die häufigsten Todesursachen weltweit darstellen. Das hat große sozio-ökonomische Auswirkungen, vor allem in der Dritten Welt. Wenn die Schulmedizin die O<sub>3</sub>-AHT als Ergänzung zur Standard-Medikation akzeptieren würde, würde ein großer Sprung nach vorn bemerkt werden.

## **B. Altersbedingte Makula-Degeneration**

Allein im Vereinigten Königreich wären rund 200.000 Patienten, die von der „trockenen“ (atrophischen) Form der Makuladegeneration betroffen sind, für die Behandlung mit O<sub>3</sub>-AHT geeignet,<sup>202</sup> aber auf der ganzen Welt gibt es etwa 30 Millionen Menschen auf der Suche nach einer Therapie. Dennoch können die Augenärzte nur Antioxidantien und Zink verschreiben, die minimal wirksam sind.<sup>203,204</sup> Seit 1995 wurden fast 1000 Patienten mit der trockenen Form der Makuladegeneration mit O<sub>3</sub>-AHT in unserer Poliklinik behandelt und bei drei Vierteln (!) von ihnen hat sich eine Verbesserung um ein bis zwei Zeilen auf dem Sehschärfediagramm gezeigt.<sup>144,205</sup>

In der Regel erlauben 15-18 Behandlungen, bei einer ersten Ozon-Konzentration von 20 mg/mL Gas pro ml Blut, langsam ausgebaut auf 60 mg/ml (zweimal wöchentlich), gefolgt von zwei monatlichen Sitzungen als Erhaltungstherapie, die Verbesserung zu erhalten. Obwohl nicht überprüft, betont diese Studie, dass O<sub>3</sub>-AHT die einzige Therapie ist, die in der Lage ist, die Lebensqualität des Patienten dramatisch zu verbessern. Bei dieser Krankheit gibt es eine fortschreitende Degeneration und die fovea-centralis-Sehzellen und das retinale Pigmentepithel (PRE) sterben als Folge von mehreren Faktoren, von denen einer die chronische Hypoxie ist, ab. Obwohl die O<sub>3</sub>-AHT eine pleiotrope Reaktion hervorruft, liegt der Hauptvorteil in der erhöhten Abgabe von Sauerstoff an die Netzhaut, die das Körpergewebe mit dem höchsten Sauerstoffverbrauch ist. Es ist wichtig zu beachten, dass O<sub>3</sub>-AHT bei der exsudativen Form der Makuladegeneration und bei multigenetischen und progressiven Erkrankungen (z. B. retinitis pigmentosa und rezessiver Morbus Stargardt) nutzlos, sogar schädlich ist.<sup>206</sup>

Die exsudative Form, charakterisiert durch ein abweichendes choroidales vaskuläres Wachstum und eine vaskuläre Hyperpermeabilität unter der Netzhaut und der PRE, wird durch eine verschlechterte Ischämie verursacht, was die Freisetzung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors negativ stimuliert.

Es ist zu betonen, dass die O<sub>3</sub>-AHT (bei der trockenen Form) nicht nur die visuelle Aktivität verbessert, sondern zumindest zum Teil den Patienten zu einem autonomen Leben befähigt.

## **C. Chronische Infektionskrankheiten**

Ozon wird als das beste aktuelle Desinfektionsmittel betrachtet, weil Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen, frei im Wasser, leicht oxidiert werden können.<sup>207,208</sup> Es ist aber enttäuschend, dass die Zerstörung der freien Erreger im Plasma durch Ozon sowohl ex vivo als auch in vivo durch Antioxidantien wie Albumin, Ascorbinsäure und Harnsäure stark behindert wird und sie praktisch unangreifbar sind, wenn sie sich intrazellulär befinden.<sup>124,125</sup> Aber die Ozontherapie verdient dennoch Beachtung, weil sie durch die Verbesserung des Stoffwechsels und indem sie als milder Zytokin-Induktor wirkt<sup>64</sup> einen positiven Einfluss auf Infektionskrankheiten hat. Es bleibt aber ein Anwendungsgebiet von O<sub>3</sub>-AHT. Als Hilfstherapie sollte sie trotzdem Beachtung finden, weil sie einen beachtlichen Einfluß bei chronischen viralen Infektionen (zB HIV, HCV, HSV), in Kombination mit einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART), PEGyliertem Interferon- $\alpha$  plus, (mit PEG konjugiert)entweder Lamivudin oder Ribavirin und Acyclovir zeigen kann. Auf der anderen Seite müssen bakterielle Septikämien mit den am besten geeigneten Antibiotika behandelt werden, um Toxämie und multisystemische organische Funktionsstörungen zu verhindern.

Für die Behandlung von bakteriellen, viralen und Pilzinfektionen, Aphthen, Verbrennungen, Abszessen und Osteomyelitis ist die topische Anwendung am wirksamsten. Entweder (i) Ozon als Gasgemisch (ca. 4% Ozon und 96% Sauerstoff);<sup>209,210</sup> oder (ii) als ozonisiertes Wasser, oder (iii) ozonisierte Öle (wo Ozon als Triozonid stabilisiert ist)<sup>208,211-214</sup>

Die topische Therapie ist am wirksamsten, wenn sie aufgrund der verbesserten Sauerstoffversorgung der hypoxischen Gewebe mit O<sub>3</sub>-AHT kombiniert wird. Radiodermatitis<sup>215</sup> und Wundheilung werden verbessert, weil ozonisierte Lösungen eine reinigende Wirkung haben, als Desinfektionsmittel wirken und die Rekonstruktion von Geweben stimulieren. In einem kürzlich durchgeführten Bericht heißt es, dass die hohe Rate von Diabetes in vielen Teilen der Welt Fußgeschwüre zu einem großen und wachsenden Problem der öffentlichen Gesundheit machen. Fußgeschwüre verursachen erhebliche Morbidität, beeinträchtigen die Lebensqualität, erzeugen sehr hohe Behandlungskosten (ca. US \$ 17.500 – 27.987) und bilden den wichtigsten Risikofaktor für die Amputation der unteren Extremitäten.<sup>216</sup>

Obwohl die ständige Verwendung von dickdarmrektaler Insufflation von O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> nicht der optimale Ansatz ist, so scheint sie die Prognose von Diabetes durch die Kombination von topischer Therapie mit ozonisiertem Öl und O<sub>3</sub>-AHT zu verbessern.<sup>217</sup> Diese Studie muss noch bestätigt werden.

Ozonisiertes Olivenöl ist eine erstaunliche Zubereitung, weil es durch die langsame Freisetzung von Sauerstoff in hypoxischem Gewebe und die Stimulation der Fibroblasten- Proliferation antibakterielle Aktivität mit heilenden Eigenschaften verbindet.<sup>212,213</sup> Chronische Geschwüre und/oder faulige Wunden gehören zu den schlimmsten und schwierigsten medizinischen Problemen, mit denen man es zu tun haben kann, die durch Ischämie, Diabetes, Immunsuppression und Unterernährung verursacht werden.

Während der letzten zehn Jahre hat sich die Anwendung von Ozon-Derivaten in solchen Fällen als sehr vorteilhaft erwiesen,<sup>143</sup> aber bisher hat die offizielle Medizin diese gute Zubereitung noch nicht entdeckt, die sehr viel effektiver ist als Salben, die oft wirkungslose Antibiotika und Kortikosteroide enthalten, die die Heilung verzögern. Wegen des aktuellen Anstiegs der Kosten im Gesundheitswesen verdienen O<sub>3</sub>-AHT und ozonisierte Öle Aufmerksamkeit, weil sie die Krankenhausassistentz verringern und preiswert sind.

#### **D. Lungenkrankheiten**

Lungenerkrankungen, wie chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD), wird bald die vierthäufigste Todesursache werden, die zusammen mit Emphysemen und Asthma für signifikante Erwerbsunfähigkeit sorgen. Mit dem Gebrauch von Kortikosteroiden, lange wirkenden  $\beta_2$ -Agonisten und Antibiotika hat die Schulmedizin sich sicherlich als hilfreich erwiesen,<sup>218</sup> aber es kann den Verlauf der COPD nicht ändern. Bei einer Reihe von älteren Patienten mit Makuladegeneration und entweder Emphysem oder COPD konnte jedoch eine bemerkenswerte Verbesserung beobachtet werden, indem man die Ozontherapie<sup>219</sup> (mit dem Schema für die Vasculopathien) mit den besten konventionellen Behandlungen kombiniert hat. Es ist bedauerlich, dass bisher eine randomisierte Studie zur Evaluation der orthodoxen Therapie mit oder ohne O<sub>3</sub>-AHT noch nicht durchgeführt wurde.

## **E. Die Vielseitigkeit der Ozonanwendung in Orthopädie und Zahnheilkunde**

Die Anwendung von Ozon bei Schmerzen im unteren Rücken hat sich als sehr effektiv erwiesen. Sie kann direkt (intradiskal)<sup>220-224</sup> oder indirekt über die intramuskuläre Verabreichung in die paravertebrale Muskulatur verabreicht werden. Die letztere Art der Verabreichung wurde einer „chemischen Akupunktur“ gleichgestellt.<sup>145</sup>

In den letzten 6 Jahren wurden in Italien mehr als 30.000 Patienten mit Bandscheibenvorfall mit einer Erfolgsquote von 62 bis 80% behandelt, benannt als Chemo-Nucleolyse. Der Wert dieses Ansatzes, minimal-invasiv und ohne Risiko, wurde bereits in mehreren Ländern anerkannt, von China bis Spanien und Südamerika.

Wie auch in einer anderen Studie über schmerzbezogene Störungen durch Sportverletzungen (232 Patienten) und entzündliche Erkrankungen (770 Probanden) gezeigt wurde,<sup>225</sup> scheint es, dass Ozon eine Vielzahl von Effekten hat, wie die Aktivierung des Anti-nozizeptiven Systems, und es hat eine entzündungshemmende Wirkung durch lipidperoxidative Produkte, mit der Folge einer Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2).<sup>226,227</sup>

Schließlich hat Ozon sich in der Zahnheilkunde für die Eliminierung von Infektionen und die Blockade kariöser Läsionen der Hauptwurzel als sehr nützlich erwiesen.<sup>228,229</sup>

Der interessierte Leser wird das bemerkenswerte Buch „Ozon: die Revolution in der Zahnheilkunde“ zu schätzen wissen.<sup>230</sup> Nach fast 80 Jahren konnte die Anschauung von Dr. Fisch keine enthusiastischere Anerkennung von Prof. Lynch empfangen.

## **8. IST DIE OZONTHERAPIE EINE SCHLECHTE KOPIE DER HYPERBAREN SAUERSTOFFTHERAPIE?**

Es wird oft vermutet, dass die Ozontherapie versucht, die Vorteile der viel besser bekannten hyperbaren Sauerstofftherapie (HOT) zu simulieren<sup>231-233</sup> und deshalb scheint es sinnvoll klarzustellen, dass diese beiden Ansätze sowohl theoretisch als auch praktisch unterschiedlich sind.

Bei dem letzteren ist das Medikament Ozon und während wir seine erste Reaktion und die Kaskade von aktiven Boten beschrieben haben, wurde auch darauf hingewiesen, dass die Sauerstoffanreicherung des Blutes nicht die primäre Absicht ist. Im Gegenteil, durch die Atmung von fast reinem Sauerstoff bei 2,6 bar in der Druckkammer erhöht sich das Volumen des gelösten Sauerstoffs im Plasma bis zu etwa 5 ml/dl, das ist genug, um ischämische Gewebe zu sättigen, auch in der Abwesenheit von vollständig sauerstoffversorgtem Hämoglobin. HOT ist nur vorübergehend wirksam, da die Hypoxie nach 2 Stunden der Therapie wieder in das ischämische Gewebe zurückkehrt und damit die therapeutische Wirkung nur vorübergehend ist. Allerdings hat HOT eine exklusive Rolle bei der CO-Vergiftung, Luftembolie, Dekompressionskrankheit, und vielleicht bei der Clostridien myonecrose, während die Ozon-Therapie sehr viel effektiver und praktischer bei POAD, Herz-Ischämie, ARMD, diabetischem Fuß, chronischen Geschwüren und Druckgeschwüren ist. So sind beide Ansätze relevant, aber jeder hat seinen ausgewählten Bereich der Anwendung und der Unterschied sollte im Interesse des Patienten verstanden werden.<sup>146</sup>

## 9. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Geschichte der Medizin erinnert uns daran, dass die Anwendung mehrerer wichtiger therapeutischer Ansätze in der Vergangenheit aufgrund von Vorurteilen, Mangel an Wissen oder durch Fehlen von Sponsoren und oft durch wirtschaftlichen Wettbewerb verzögert wurde. Ozon ist preiswert aber deshalb macht die Ozontherapie keine Ausnahme, trotz der Tatsache, dass alle chemischen, biochemischen, physiologischen und pharmakologischen Mechanismen, ausgelöst durch Ozon, als „*primum movens*“ im Bereich der orthodoxen Medizin liegen. Man fragt sich, ob nun, mit dem Aufkommen der molekularen Medizin und der Genterapie, die Ozontherapie veraltet ist oder ob es sinnvoll ist, sie zu verfolgen. Unsere vielen behandelten Patienten antworten für uns, indem sie sagen, dass sie sehr nützlich ist. Die Übereinstimmung ist ausgezeichnet und die Patienten fragen, sobald die therapeutische Wirkung abnimmt, nach einem neuen Zyklus, was den Nutzen und das Fehlen von Nebenwirkungen zeigt. Es ist bedauerlich, dass in der Vergangenheit die direkte intravenöse Injektion des Gases, jetzt verboten, die Verwendung von frühen ( nicht geprüften )Ozongeneratoren und der Missbrauch von Ozon durch inkompetente Quacksalber ernsthafte Bedenken hinsichtlich seiner Validität generiert haben. Darüber hinaus, haben pulmonale Toxizität durch längeres Einatmen von verschmutzter Luft und viele unphysiologische Studien, z.B. durchgeführt mit in Kochsalzlösung gewaschenen Erythrozyten, ungeschützt durch die starken Plasmaantioxidantien, das Dogma unterstützt, dass Ozon immer giftig sei und in der Medizin nicht verwendet werden sollte. Dieses Konzept lässt sich nicht verallgemeinern, weil es den grundlegenden Unterschied zwischen dem endogenen chronischen oxidativen Stress durch Alterung oder wegen einer chronischen Krankheit, und dem kalkulierten sehr kurzen und gut kalibrierten oxidativen Stress auf das Blut durch den Gebrauch einer präzisen und kleinen Ozon-Dosis nicht berücksichtigt. Wenn die geeignete Dosis Ozon mit den Biomolekülen reagiert, dann ergibt sich eine Reihe von Verbindungen, die trotz ihrer inhärenten Toxizität, dank ihrer Pharmakodynamik wichtige biochemische Wege stimuliert. Tatsächlich hängt die medizinische Wirkung von der kritischen Balance zwischen einer angemessenen kleinen Dosis von Ozon und nahezu unendlich reagierenden Variablen ab, wie die Vielfalt von Antioxidantien, die Lebensdauer von ROS und LOP, ihre In-vivo-Pharmakokinetik und vor allem die Variabilität der biologischen Reaktion, abhängig von Enzymreaktion und dem Stadium der Krankheit.

Seit der Entdeckung von NO als physiologischer Bote werden andere gasförmige Moleküle wie CO, H<sub>2</sub>S, und H<sub>2</sub>,<sup>234-236</sup> obwohl sie als potenziell toxische Moleküle bekannt sind, nun als mögliche Therapeutika betrachtet, wenn sie umsichtig eingesetzt werden. Jedes Medikament, abhängig von seiner Dosierung kann entweder therapeutisch oder toxisch sein. Ein markantes Beispiel dafür ist die wichtige Verbindung Glucose, deren normale Konzentration im Plasma zwischen 0,7 und 1,0 mg/ml beträgt. Allerdings, wenn diese Konzentration unter 0,4 mg/ml fällt, kann das daraus resultierende hypoglycaemische Koma tödlich sein. Wenn die Glukosekonzentration andererseits konstant über 1,3 mg / ml bleibt, leitet es das metabolische Syndrom, das durch die derzeitige Diabetes-Epidemie deutlich dargestellt wird.

Sauerstoff schließlich ermöglicht es uns bei einer Konzentration von 21% in der Luft (und einem arteriellen  $pO_2$  von etwa 99 mmHg), fast 80 Jahre lang zu leben, aber er ist tödlich, wenn wir für ein paar Tage reinen Sauerstoff atmen.

Während also eine weitere Diskussion über die Ozontoxizität in der Medizin aussichtslos erscheint, ist es wichtig zu prüfen, ob die Ozontherapie in der Tat in der Lage sein wird, einen angemessenen Platz unter dem medizinischen Rüstzeug zu erwerben. In den letzten zehn Jahren hat die Ozon-Therapie große Aufmerksamkeit in den weniger entwickelten Ländern auf sich gezogen, während sie in den USA zum Teil noch verboten und in anderen entwickelten Ländern schlecht angesehen ist. Was kann getan werden, um diese schwierige Perspektive zu ändern? Heute haben wir einen umfassenden Rahmen für das Verständnis der biochemischen und biologischen Auswirkungen des Ozons und wir haben zumindest teilweise die Möglichkeit, die Ozontherapie bei ausgewählten Erkrankungen entweder als erste Wahl oder besser noch in Kombination mit der orthodoxen Therapie zu empfehlen. Deshalb müssen wir erstens weiterhin spezielle Kurse für Ärzte zur Vermeidung konzeptioneller oder technischer Fallstricke organisieren. Zweitens, während es wichtig ist, spezifische biologische Studien fortzusetzen, ist es unerlässlich, kontrollierte und groß angelegte klinische Studien durchzuführen, um den Wert der Ozontherapie zumindest bei Gefäßerkrankungen zweifelsfrei zu beweisen. Wenn dies nicht erledigt wird, gibt es innerhalb der offiziellen Medizin keine Zukunft für die Ozontherapie. Steine des Anstoßes sind der Mangel an Sponsoren, das Desinteresse der pharmazeutischen Industrie und die Vernachlässigung durch die Gesundheitsbehörden. Da die Ozontherapie eine sehr preisgünstige Behandlung ist, vor allem, wenn sie in allen Krankenhäusern auf täglicher Basis durchgeführt wird, wird es sowohl die medizinischen Kosten als auch die Invalidität deutlich reduzieren. Fast überflüssig zu sagen, dass die Ozon-Therapie wie die Schulmedizin zahlreiche menschliche Erkrankungen wie Makuladegeneration, Arteriosklerose und Stoffwechselerkrankungen nicht „heilen“ kann. Allerdings könnte die Erhaltungstherapie, verbunden mit herkömmlichen Medikamenten, das Leben vieler Patienten verbessern. Indem man die enormen Kosten von zuverlässig kontrollierten randomisierten klinischen Studien, es sei denn, die Gesundheitsbehörden geben finanzielle Unterstützung, betrachtet, wird die Ozontherapie in der Schwebe bleiben und in den Händen von privaten Ärzten, die nur anekdotische Berichte und nutzlose Daten geben können. Nur wissenschaftlich gut dargestellte therapeutische Vorteile werden in der Lage sein, Vorurteile zu entkräften und der Sauerstoff-Ozon-Therapie erlauben, eine weltweite nützliche medikamentöse Behandlung zu werden.

## 10. ABKÜRZUNGEN

4-HNE	4-Hydroxynonal
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ARMD	altersbedingte Makuladegeneration
ASF	Atemwegsoberflächenflüssigkeit
ATP	Adenosintriphosphat
BMC	mononukleare Blutzellen
CAT	Katalase
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
CGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHF	chronische Herzinsuffizienz
CNS	zentrales Nervensystem
CO	Kohlenmonoxid
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX-2	Cyclooxygenase-2
DPG	2,3-Diphosphoglycerat
ELF	Epithelische Auskleidungsflüssigkeit
G6PHD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSH-Rd	Glutathionreduktase
GSPase	Glutathionperoxidase
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HClO	hypochlorige Säure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Menschliches Immundefizitvirus)
HO-1	Hämo-Oxygenase-1
HOT	hyperbare Sauerstofftherapie
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSP	Hitze-Stress-Proteine
HSV	Herpes Simplex-Viren
HUVEC	humane vaskuläre endotheliale Zellen
IFN <sub>γ</sub>	Interferon gamma
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
LDH	Lactat-Dehydrogenase
L-NAME	<i>n</i> -omega-nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
LOP	Lipidoxidationsprodukte
MA	Acetylcystein („mercapturic acid“ )
MDA	Malondialdehyd
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NF-κB	Nuclearfactor-κB
NO	Stickstoffmonoxid
N <sub>2</sub> O	Distickstoffoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
·OH	Hydroxyl-Radikal
O <sub>3</sub> -AHT	Ozon Eigenblutbehandlung
PDGF	Thrombozytenabhängiger Wachstumsfaktor
POAD	periphere obstruktive arterielle Verschlusskrankheit
ppm	parts per million (Teile pro Million)
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren

RBC	rote Blutkörperchen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
PRE	pigmentiertes retinales Epithel
SOD	Superoxiddismutase
TAS	gesamter antioxidativer Status
TBARS	Thiobarbitursäure Reaktivstoffe
TGFβ1	Transformierender Wachstumsfaktor β1
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Trx	Thioredoxin
UV	UV-Strahlung
VEGF	Vasculärer Endothelzellen- Wachstumsfaktor

<p><b>ACKNOWLEDGMENTS</b></p> <p>One of us (V.B.) is grateful to the University of Siena for the permission to continue to work in the Department of Physiology as Emeritus Professor of Physiology. We are grateful and thank Mrs. Helen Carter for revising the English manuscript.</p> <p><b>REFERENCES</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Burns DT. Early problems in the analysis and the determination of ozone. <i>Fresenius J Anal Chem</i> 1997;357:178–183.</li> <li>2. Rubin MB. The history of ozone. The Schönbein period, 1839–1868. <i>Bull Hist Chem</i> 2001;26:40–56.</li> <li>3. Battino R. Oxygen and ozone. IUPAC solubility data series. Vol. 7. Oxford, UK: Pergamon Press; 1981.</li> <li>4. Kogelschatz U, Eliasson B, Hirth M. Ozone generation from oxygen and air: Discharge physics and reaction mechanisms. <i>Ozone Sci Eng</i> 1988;10:367–378.</li> <li>5. Tanaka T, Morino Y. Coriolis interaction and anharmonic potential function of ozone from the microwave spectra in the excited vibrational states. <i>J Mol Spectrosc</i> 1970;33:538–551.</li> <li>6. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). <i>N Engl J Med</i> 1978;298:659–668.</li> <li>7. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts). <i>N Engl J Med</i> 1978;298:721–725.</li> <li>8. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. <i>Free Radic Biol Med</i> 2007;42:153–164.</li> </ol>	<p><b>DANKSAGUNG</b></p> <p>Einer von uns (Velio Bocci) dankt der Universität von Siena für die Erlaubnis, weiterhin als emeritierter Professor für Physiologie in der Abteilung für Physiologie zu arbeiten. Wir sind dankbar und danken Frau Helen Carter für die Überarbeitung des englischen Manuskripts.</p> <p><b>REFERENZEN</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Burns DT. Frühe Probleme bei der Analyse und der Bestimmung von Ozon. <i>Fresenius J Anal Chem</i> 1997; 357:178-183.</li> <li>2. Rubin MB. Die Geschichte des Ozons. Die Schönbeinperiode 1839-1868. <i>Bull Hist Chem</i> 2001; 26:40-56.</li> <li>3. Battino R. Sauerstoff und Ozon. IUPAC Löslichkeit Datenreihe. Vol. 7. Oxford, UK: Pergamon Press, 1981.</li> <li>4. Kogelschatz U, Eliasson B, Hirth M. Ozonerzeugung aus Sauerstoff und Luft: Entladungsphysik und Reaktionsmechanismen. <i>Ozone Sci Eng</i> 1988; 10:367-378.</li> <li>5. Tanaka T, Y. Morino Coriolis-Interaktion und anharmonische potenzielle Funktion von Ozon aus den Mikrowellenspektren in angeregten Schwingungszuständen. <i>J Mol Spectrosc</i> 1970; 33:538-551.</li> <li>6. Babior BM. Sauerstoffabhängige Abtötung von Mikroorganismen durch Phagozyten (erster von zwei Teilen). <i>N Engl J Med</i> 1978; 298:659-668.</li> <li>7. Babior BM. Sauerstoff-abhängige Abtötung von Mikroorganismen durch Phagozyten (zweite von zwei Teilen). <i>N Engl J Med</i> 1978; 298:721-725.</li> <li>8. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies als Signalmoleküle, die die Neutrophilenfunktion regeln. <i>Free Radic Biol Med</i> 2007; 42:153-164.</li> </ol>
--	--

<p>9. Wentworth Jr P, Wentworth AD, Zhu X, Wilson IA, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA. Evidence for the production of trioxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2003;100:1490–1493.</p> <p>10. Wentworth Jr P, Nieva J, Takeuchi C, Galve R, Wentworth AD, Dilley RB, DeLaria GA, Saven A, Babior BM, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA. Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. <i>Science</i> 2003;302:1053–1056.</p> <p>11. Smith LL. Oxygen, oxysterols, ouabain, and ozone: A cautionary tale. <i>Free Radic Biol Med</i> 2004;37:318–324.</p> <p>12. Heng S, Yeung KL, Djafer M, Schrotter J-C. A novel membrane reactor for ozone water treatment. <i>J Membr Sci</i> 2007;289:67–75.</p> <p>13. Rozema J, Björn LO, Bornman JF, Gaberik A, Haider D-P, Trot T, Germ M, Klisch M, Groniger A, Sinha RP, Lebert M, He Y-Y, Buffoni-Hall R, de Bakker NVJ, van de Staaij J, Meijkamp BB. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems—an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. <i>J Photochem Photobiol B</i> 2002;66:2–12.</p> <p>14. US Environmental Protection Agency. National ambient air quality standards for ozone; final rule. Available at: <a href="http://www.epa.gov/air/ozonepollution/pdfs/2008_03_finalrule.pdf">http://www.epa.gov/air/ozonepollution/pdfs/2008_03_finalrule.pdf</a>. Accessed October 13, 2008.</p> <p>15. Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F. Ozone and short-term mortality in 95 US urban communities, 1987–2000. <i>J Am Med Assoc</i> 2004;292:2372–2378.</p> <p>16. Mortimer KM, Tager IB, Dockery DW, Neas L, Redline S. The effect of ozone on inner-city children with asthma: Identification of susceptible subgroups. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 2000;162:1838–1845.</p> <p>17. Ruidavets JB, Cournot M, Cassadou S, Giroux M, Meybeck M, Ferrieres J. Ozone air pollution is associated with acute myocardial infarction. <i>Circulation</i> 2005;111:563–569.</p>	<p>9. Wentworth Jr P, Wentworth AD, Zhu X, Wilson IA, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA. Der Nachweis für die Herstellung von Arten von dreiwertigem Sauerstoff während antikörperkatalysierter chemischer Modifikation von Antigenen. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 2003; 100:1490-1493.</p> <p>10. Wentworth Jr P, Nieva J, Takeuchi C, Galve R, Wentworth AD, Dilley RB, Candelária GA, Saven A, Babior BM, Janda KD, Eschenmoser A, Lerner RA. Der Nachweis für die Bildung von Ozon in den menschlichen atherosklerotischen Arterien. <i>Science</i> 2003; 302:1053-1056.</p> <p>11. Smith LL. Sauerstoff, Oxysterole, Ouabain und Ozon: Ein warnendes Beispiel. <i>Free Radic Biol Med</i> 2004; 37:318-324.</p> <p>12. Heng S, Yeung KL, Djafer M, Schrötter J-C. Ein neuartiger Membranreaktor für Ozon-Wasseraufbereitung. <i>J Membr Sci</i> 2007; 289:67-75.</p> <p>13. Rozema J, Björn LO, Bornman JF, Gaberik A, Haider DP, Trot T, Germ M, Klisch M, Groniger A, Sinha RP, Lebert M, He YY, Buffoni-Hall R, de Bakker NVJ, van de Staaij J, Meijkamp BB. Die Rolle der UV-B-Strahlung in aquatischen und terrestrischen Ökosystemen- eine experimentelle und funktionelle Analyse der Entwicklung von UV-absorbierenden Verbindungen. <i>J Photochem Photobiol B</i> 2002; 66:2-12.</p> <p>14. US Environmental Protection Agency. Nationale Luftqualitätsnormen für Ozon; endgültige Regelung. Available at: <a href="http://www.epa.gov/air/ozonepollution/pdfs/2008_03_finalrule.pdf">http://www.epa.gov/air/ozonepollution/pdfs/2008_03_finalrule.pdf</a>. Accessed 13. Oktober 2008.</p> <p>15. Bell ML, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, Dominici F. Ozon- und kurzfristige Mortalität in 95 städtischen USA-Gemeinden, 1987-2000. <i>J Am Med Assoc</i> 2004; 292:2372-2378.</p> <p>16. Mortimer KM, Tager IB, Dockery DW, Neas L, Redline S. Die Wirkung des Ozons auf Innenstadtkinder mit Asthma: Identifizierung von anfälligen Untergruppen. <i>Am J Respir Crit Care Med</i> 2000; 162:1838-1845.</p> <p>17. Ruidavets JB, Cournot M, Cassadou S, Giroux M, Meybeck M, Ferrieres J. Ozonbelastung ist mit akutem Herzinfarkt verbunden. <i>Circulation</i> 2005; 111:563-569.</p>
--	---

18. Tager IB, Balmes J, Lurmann F, Ngo L, Alcorn S, Kunzli N. Chronic exposure to ambient ozone and lung function in young adults. *Epidemiology* 2005;16:751–759.
19. Lippman M. Health effects of ozone, a critical review. *J Am Air Pollut Control Assoc* 1989;39:672–695.
20. Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med* 1990;9:245–265.
21. Bastacky J, Lee CYC, Goerke J, Koushafar H, Yager D, Kenaga L, Speed TP, Chen Y, Clements JA. Alveolar lining layer is thin and continuous: Low-temperature scanning electron microscopy of rat lung. *J Appl Physiol* 1995;79:1615–1628.
22. Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnell KM, Pinkston P, Martin PG, Crystal RG. Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *J Appl Physiol* 1986;60:532–538.
23. Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med* 1994;17:451–465.
24. Kelly FJ, Mudway I, Krishna MT, Holgate ST. The free radical basis of air pollution: Focus on ozone. *Respir Med* 1995;89:647–656.
25. Hamilton Jr RF, Eschenbacher WL, Szweda L, Holian A. Potential involvement of 4-hydroxynonenal in the response of human lung cells to ozone. *Am J Physiol* 1998;274:L8–L16.
26. Spickett CM, Jerlich A, Panasencko OM, Arnhold J, Pitt AR, Stelmaszynska T, Schaur RI. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* 2000;47:889–899.
27. Cho HY, Zhang LY, Kleeberger SR. Ozone-induced lung inflammation and hyperreactivity are mediated via tumor necrosis factor-alpha receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L537–L546.
28. Goldkorn T, Khan EM. Dual roles of oxidative stress in the lungs. In: Valacchi G, Davis P, editors. *Oxidants in biology*. The Netherlands: Springer; 2008. pp 231–250.
29. Long NC, Suh J, Morrow JD, Schiestl RH, Murthy GG, Brain JD, Frei B. Ozone causes lipid peroxidation but little antioxidant depletion in exercising and nonexercising hamsters. *J Appl Physiol* 2001;91:1694–1700.
30. Montuschi P, Nightingale JA, Kharitonov SA, Barnes PJ. Ozone-induced increase in exhaled 8-isoprostane in healthy subjects is resistant to inhaled budesonide. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1403–1408.
31. Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori M, Folesani G, Mozzoni P, Cavazzini S, Bergamaschi E, Rossi L, Mutti A. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett* 2002;134:219–225.
32. Last JA, Gohil K, Mathrani VC, Kenyon NJ. Systemic responses to inhaled ozone in mice: Cachexia and down-regulation of liver xenobiotic metabolizing genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;208:117–126.
33. Bocci V. Interleukins. *Clinical pharmacokinetics and practical implications*. *Clin Pharmacokinet* 1991;21:274–284.
34. Bocci V. Physicochemical and biologic properties of interferons and their potential uses in drug delivery systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1992;9:91–133.
35. Alary J, Geuraud F, Cravedi JP. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: Disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med* 2003;24:177–187.
36. Siems W, Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003;24:167–175.
37. Awasthi YC, Ansari GA, Awasthi S. Regulation of 4-hydroxynonenal mediated signaling by glutathione S-transferase. *Methods Enzymol* 2005;401:379–407.
38. Sweet F, Kao MS, Lee SC, Hagar WL, Sweet WE. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science* 1980;209:931–933.
39. Tarkington BK, Duvall TR, Last JA. Ozone exposure of cultured cells and tissues. *Methods Enzymol* 1994;234:257–265.
40. Larini A, Bianchi L, Bocci V. The ozone tolerance: (I) Enhancement of antioxidant enzymes is ozone dose-dependent in Jurkat cells. *Free Radic Res* 2003;37:1163–1168.
41. Leist M, Raab B, Maurer S, Brigelius-Flohe R. Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidants and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. *Free Radic Biol Med* 1996;21:297–306.
42. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 1996;16:33–50.
43. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31:261–272.
44. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem? *FEBS Lett* 2003;540:3–6.
45. Larini A, Bianchi L, Bocci V. Effect of 4-hydroxynonenal on antioxidant capacity and apoptosis induction in Jurkat T cells. *Free Radic Res* 2004;38:509–516.

46. Larini A, Bocci V. Albumin is the most effective antioxidant during human plasma and blood ozonization. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia* 2004;3:15–24.
47. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Aldinucci C, Silvestri S, Paccagnini E, Gerli R. Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *J Biol Regul Homeost Agents* 1998;12:67–75.
48. Bocci V. Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? *Med Hypotheses* 1996;46:150–154.
49. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006;37:425–435.
50. Stoker G. The surgical uses of ozone. *Lancet* 1916;188:712.
51. Stoker G. The surgical uses of ozone. *Lancet* 1917;189:797.
52. Fish E. Apparatus for the production and use of ozone in therapeutics. United States Patent 2,054,367. September 15, 1936.
53. Kuhn K, Seifert V. Erwin Payr and his contributions to neurosurgery. *Zentralbl Neurochir* 1998;59:27–35.
54. Bocci V. Oxygen–ozone therapy. A critical evaluation. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2002. 440p.
55. Timbrell J. The poison paradox; chemicals as friends and foes. Oxford: Oxford University Press; 2005. 352p.
56. Hunter P. A toxic brew we cannot live without. Micronutrients give insight into the interplay between geochemistry and evolutionary biology. *EMBO Rep* 2008;9:15–18.
57. Cataldo F, Gentilini L. Chemical kinetics measurements on the reaction between blood and ozone. *Int J Biol Macromol* 2005;36:61–65.
58. Bocci V, Travagli V. How an ill-conceived methodological approach can condemn the medical use of ozone therapy. *Int J Biol Macromol* 2005;37:287–288.
59. Van der Vliet A, O'Neil CA, Eiserich JP, Cross CE. Oxidative damage to extracellular fluids by ozone and possible protective effects of thiols. *Arch Biochem Biophys* 1995;321:43–50.
60. Bocci V. The question of balance: The interaction between blood and ozone. In: Valacchi G, Davis P, editors. *Oxidants in biology*. The Netherlands: Springer; 2008. pp 155–165.
61. Cross CE, Reznick AZ, Packer L, Davis PA, Suzuki YJ, Halliwell B. Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. *Free Radic Res Commun* 1992;15:347–352.
62. Mulholland CW, Strain JJ. Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) of plasma: Effects of supplementation. *Int J Vitam Nutr Res* 1993;63:27–30.
63. Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation/ozonation. *J Biochem Mol Toxicol* 2006;20:133–138.
64. 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.
65. Shinriki N, Suzuki T, Takama K, Fukunaga K, Ohgiya S, Kubota K, Miura T. Susceptibilities of plasma antioxidants and erythrocyte constituents to low levels of ozone. *Haematologia* 1998;29:229–239.
66. Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: Antioxidant effects in blood. *Free Radic Biol Med* 1998;24:789–797.
67. Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Enzyme-dependent ascorbate recycling in human erythrocytes: Role of thioredoxin reductase. *Free Radic Biol Med* 1998;25:221–228.
68. Uppu RM, Cueto R, Squadrito GL, Pryor WA. What does ozone react with at the air/lung interface? Model studies using human red blood cell membranes. *Arch Biochem Biophys* 1995;319:257–266.
69. Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Radical Biol Med* 1995;19:935–941.
70. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000;486:10–13.
71. Halliwell B, Clement MV, Ramalingam J, Long LH. Hydrogen peroxide: Ubiquitous in cell culture and in vivo? *IUBMB Life* 2000;50:251–257.
72. Antunes F, Cadenas E. Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS Lett* 2000;475:121–126.
73. Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as medical drug. *Rivista Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia* 2005;4:30–39.
74. Stone JR, Yang S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:243–270.
75. Forman HJ. Hydrogen peroxide: The good, the bad and the ugly. In: Valacchi G, Davis P, editors. *Oxidants in biology*. The Netherlands: Springer; 2008. pp 1–17.
76. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141–179.
77. Los M, Droge W, Stricker K, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. *Eur J Immunol* 1995;25:159–165.
78. Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium* 2002;9:231–238.

79. Grisham MB. Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radic Biol Med* 2004;36: 1479–1480.
80. Ardanaz N, Pagano PJ. Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: Regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med* 2006;231:237–251.
81. Allen RC, Loose LD. Phagocytic activation of a luminol-dependent chemiluminescence in rabbit alveolar and peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;69: 245–252.
82. Urschel HC. Cardiovascular effects of hydrogen peroxide: Current status. *Dis Chest* 1967;51: 180–192.
83. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998; 16:291–303.
84. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:909–913.
85. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 1994;234:279–293.
86. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Paulesu L, Rossi R, Cardaioli E, Di Simplicio P. Studies on the biological effects of ozone: 4. Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes. *J Biol Regul Homeost Agents* 1993;7:133–138.
87. Packer L, Roy S, Sen CK. Alpha-lipoic acid: A metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. *Adv Pharmacol* 1997;38:79–101.
88. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 2004;37:937–945.
89. Poli G, Schaur RJ, Siems WG, Leonarduzzi G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Med Res Rev* 2008;28:569–631.
90. Toyokuni S, Yamada S, Kashima M, Ihara Y, Yamada Y, Tanaka T, Hiai H, Seino Y, Uchida K. Serum 4-hydroxy-2-nonenal-modified albumin is elevated in patients with type 2 diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:681–685.
91. Aldini G, Gamberoni L, Orioli M, Beretta G, Regazzoni L, Maffei Facino R, Carini M. Mass spectrometric characterization of covalent modification of human serum albumin by 4-hydroxytrans-2-nonenal. *J Mass Spectrom* 2006;41:1149–1161.
92. Aldini G, Vistoli G, Regazzoni L, Gamberoni L, Facino RM, Yamaguchi S, Uchida K, Carini M. Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: A protective role against proatherogenic electrophilic reactive carbonyl species? *Chem Res Toxicol* 2008;21:824–835.
93. Selley ML, Bartlett MR, McGuinness JA, Hapel AJ, Ardlie NG, Lacey MJ. Determination of the lipid peroxidation product trans-4-hydroxy-2-nonenal in biological samples by high-performance liquid chromatography and combined capillary column gas chromatography-negative-ion chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr* 1989;488:329–340.
94. Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radic Res* 2006;40:495–505.
95. Esterbauer H, Zollner H, Lang J. Metabolism of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by isolated hepatocytes and by liver cytosolic fractions. *Biochem J* 1985;228:363–373.
96. Siems W, Zollner H, Esterbauer H. Metabolic pathways of lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in hepatocytes. Quantitative assessment of an antioxidative defense system. *Free Radic Biol Med* 1990;9:110.
97. Ramana KV, Bhatnagar A, Srivastava S, Yadav UC, Awasthi S, Awasthi YC, Srivastava SK. Mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): Role of aldose reductase-catalyzed reduction of the HNE-glutathione conjugates in regulating cell growth. *J Biol Chem* 2006;281: 17652–17660.
98. Alary J, Bravais F, Cravedu JP, Debrauwer L, Rao D, Bories G. Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the rat. *Chem Res Toxicol* 1995;8:34–39.
99. Forman HJ, Dickinson DA, Iles KE. HNE-signaling pathways leading to its elimination. *Mol Aspects Med* 2003;24:189–194.
100. Forman HJ, Dickinson DA. Introduction to serial reviews on 4-hydroxy-2-nonenal as a signaling molecule. *Free Radic Biol Med* 2004;37:594–596.
101. Schaur RJ, Zollner H, Esterbauer H. Biological effects of aldehydes with particular attention to hydroxynonenal and malondialdehyde. In: Vigo-Pelfrey C, editor. *Membrane lipid peroxidation*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991. pp 141–163.
102. Leonarduzzi G, Parola M, Muzio G, Garramone A, Maggiora M, Robino G, Poli G, Dianzani MU, Canuto RA. Hepatocellular metabolism of 4-hydroxy-2,3-nonenal is impaired in conditions of chronic cholestasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:669–675.
103. Petras T, Siems W, Grune T. 4-Hydroxynonenal is degraded to mercapturic acid conjugate in rat kidney. *Free Radic Biol Med* 1995;19:685–688.

104. Jardines D, Correa T, Ledea O, Zamora Z, Rosado A, Molerio J. Gas chromatography-mass spectrometry profile of urinary organic acids of Wistar rats orally treated with ozonized unsaturated triglycerides and ozonized sunflower oil. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;783:517–525.
105. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal from pathology to physiology. *Mol Aspects Med* 2003;24:263–272.
106. Leonarduzzi G, Robbesyn F, Poli G. Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1694–1702.
107. Yang YS, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol* 2003;50:319–336.
108. Dwivedi S, Sharma A, Patrick B, Sharma R, Awasthi YC. Role of 4-hydroxynonenal and its metabolites in signaling. *Redox Rep* 2007;12:4–10.
109. Kutuk O, Basaga H. Apoptosis signalling by 4-hydroxynonenal: A role for JNK-c-Jun/AP-1 pathway. *Redox Rep.* 2007;12:30–34.
110. Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2008;44:247–256.
111. Travagli V, Zanardi I, Bocci V. A realistic evaluation of the action of ozone on whole human blood. *Int J Biol Macromol* 2006;39:317–320.
112. Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol* 2007;41:504–511.
113. Goldstein BD, Balchum OJ. Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell. *Exp Biol Med* 1967;126:356–358.
114. Freeman BA, Miller BE, Mudd JB. Reaction of ozone with human erythrocytes. In: Lee SD, Mudd JB, editors. *Assessing toxic effects of environmental pollutants*. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science Publisher; 1979. pp 151–171.
115. Van der Zee J, van Beek E, Dubbelman TMAR, van Stevenick J. Toxic effects of ozone on murine L929 fibroblasts. Damage to DNA. *Biochem J* 1987;247:69–72.
116. Fukunaga K, Nakazono N, Suzuki T, Takama K. Mechanism of oxidative damage to fish red blood cells by ozone. *IUBMB Life* 1999;48:631–634.
117. Go´rnicki A, Gutsze A. In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: An EPR study. *Acta Biochim Pol* 2000;47:963–971.
118. Du Plessis LH, Van der Westhuizen FH, Kotze HF. The effect of blood ozonation on mitochondrial function and apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in the presence and absence of antioxidants. *Afr J Biotechnol* 2007;6:1763–1769.
119. Du Plessis LH, Van der Westhuizen FH, Kotze HF. The protective effect of plasma antioxidants during ozone autohemotherapy. *Afr J Biotechnol* 2008;7:2472–2477.
120. Galleano M, Puntaruolo S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim Biophys Acta* 1995;1271:321–326.
121. Caglayan S, Bayer R. Effects of oxidative stress on erythrocyte deformability and fragility. *Proc SPIE* 2100 1994;182:183–189.
122. Herna´ndez F, Mene´ndez S, Wong R. Decrease of blood cholesterol and stimulation of antioxidative response in cardiopathy patients treated with endovenous ozone therapy. *Free Radic Biol Med* 1995;19:115–119.
123. Herna´ndez Rosales FA, Calunga Ferna´ndez JL, Turrent Figueras J, Mene´ndez Cepero S, Montenegro Perdomo A. Ozone therapy effects on biomarkers and lung function in asthma. *Arch Med Res* 2005;36:549–554.
124. Bocci V, Venturi G, Catucci M, Valensin PE, Zazzi M. Lack of efficacy of ozone therapy in HIV infection. *Clin Microbiol Infect* 1998;4:667–669.
125. Burgassi S, Zanardi I, Travagli V, Montomoli M, Bocci V. How much ozone bactericidal activity is compromised by plasma components? *J Appl Microbiol*, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04141.x.
126. Margalit M, Attias E, Attias D, Elstein D, Zimran A, Matzner Y. Effect of ozone on neutrophil duction in vitro. *Clin Lab Haematol* 2001;23:243–247.
127. Larini A, Bocci V. Effects of ozone on isolated peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol In Vitro* 2005;19:55–61.
128. Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon on human gamma leucocytes. *Haematologica* 1990;75:510–515.
129. Bocci V. Roles of interferon produced in physiological conditions. A speculative review. *Immunology* 1988;64:1–9.
130. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediators Inflamm* 1998;7:313–317.
131. Bocci V, Valacchi G, Rossi R, Giustarini D, Paccagnini E, Pucci AM, Di Simplicio P. Studies on the biological effects of ozone: 9. Effects of ozone on human platelets. *Platelets* 1999;10:110–116.
132. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm* 1999;8:205–209.
133. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm* 2000;9:271–276.
134. Stamler JS. S-nitrosothiols in the blood: Roles, amounts, and methods of analysis. *Circ Res* 2004;94:414–417.

135. Gladwin MT, Schechter AN. NO contest: Nitrite versus S-nitroso-hemoglobin. *Circ Res* 2004;94:851–855.
136. Foresti R, Bains S, Sulc F, Farmer PJ, Green CJ, Motterlini R. The interaction of nitric oxide with distinct hemoglobins differentially amplifies endothelial heme uptake and heme oxygenase-1 expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:1125–1133.
137. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free Radic Res* 1998;28:553–560.
138. Bocci V. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005; 295p.
139. Bocci V. Rectal insufflation of oxygen–ozone. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 49–56.
140. Bocci V. Quasi-total body exposure to oxygen–ozone. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 56–65.
141. Bocci V. Extracorporeal blood circulation against oxygen–ozone. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 66–73.
142. Bocci V. Minor ozone autohemotherapy. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 42–44.
143. Bocci V. Infection diseases (bacterial, viral, fungal, parasitic). Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 100–122.
144. Bocci V. Retinal degenerative disorders. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 132–144.
145. Bocci V. The paradoxical effect of ozone in orthopaedic diseases. The problem of back-ache. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 198–208.
146. Bocci V. The dilemma between hyperbaric oxygen therapy (HOT) and ozonotherapy. Ozone. A new medical drug. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005. pp 227–230.
147. Kangasjaarvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R. Plant defence system induced by ozone. *Plant Cell Environ* 1994;17:783–794.
148. Sharma YK, León J, Raskin I, Davis KR. Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: The role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5099–5104.
149. Desikan R, Neill SJ, Hengcock JT. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic Biol Med* 2000;28:773–778.
150. Ranieri A, Petacco F, Castagna A, Soldatini GF. Redox state and peroxidase system in sunflower plants exposed to ozone. *Plant Sci* 2001;159:159–167.
151. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124–1136.
152. Kume M, Yamamoto Y, Saad S, Gomi T, Kimoto S, Shimabukuro T, Yagi T, Nakagami M, Takada Y, Morimoto T, Yamaoka Y. Ischemic preconditioning of the liver in rats: Implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1996;28:251–258.
153. León OS, Meneández 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;7:289–294.
154. Sun JS, Lu FJ, Huang WC, Hou SM, Tsuang YH, Hang YS. Antioxidant status following acute ischemic limb injury: A rabbit model. *Free Radic Res* 1999;31:9–21.
155. Barber E, Meneández S, León OS, Barber MO, Merino N, Calunga JL, Cruz E, Bocci V. Prevention of renal injury after induction of ozone tolerance in rats submitted to warm ischaemia. *Mediators Inflamm* 1999;8:37–41.
156. Yamamoto H, Yamamoto Y, Yamagami K, Kume M, Kimoto S, Toyokuni S, Uchida K, Fukumoto M, Yamaoka Y. Heat-shock preconditioning reduces oxidative protein denaturation and ameliorates liver injury by carbon tetrachloride in rats. *Res Exp Med (Berl)* 2000;199:309–318.
157. Peralta C, Xaus C, Bartrons R, León OS, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Effect of ozone treatment on reactive oxygen species and adenosine production during hepatic ischemia-reperfusion. *Free Radic Res* 2000;33:595–605.
158. Goldman M. Cancer risk of low-level exposure. *Science* 1996;271:1821–1822.
159. Wolff S. Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat Res* 1996;358:135–142.
160. Calabrese EJ. Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in the toxicological sciences. *Environ Pollut* 2005;138:379–411.
161. Calabrese EJ. Hormesis and medicine. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66:594–617.
162. Stark M. Hormesis, adaptation, and the sandpile model. *Crit Rev Toxicol* 2008;38:641–644.
163. Olivieri G, Bodycote J, Wolff S. Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science*. 1984;223:594–597.
164. Iles KE, Liu RM. Mechanisms of glutamate cysteine ligase (GCL) induction by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2005;38:547–556.
165. Maines MD. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:517–554.
166. Bach FH. Heme oxygenase-1 as a protective gene. *Wien Klin Wochenschr* 2002;114:1–3.

167. Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16093–16098.
168. Zuckerbraun BS, Billiar TR. Heme oxygenase-1: A cellular Hercules. *Hepatology* 2003;37:742–744.
169. Iles KE, Dickinson DA, Wigley AF, Welty NE, Blank V, Forman HJ. HNE increases HO-1 through activation of the ERK pathway in pulmonary epithelial cells. *Free Radic Biol Med* 2005;39:355–364.
170. 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;2007:26785.
171. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 2008;60:79–127.
172. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM. Ferritin: A cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992;267:18148–18153.
173. Su WY, Gordon T. In vivo exposure to ozone produces an increase in a 72-kDa heat shock protein in guinea pigs. *J Appl Physiol* 1997;83:707–711.
174. Polidori MC, Mecocci P, Levine M, Frei B. Short-term and long-term vitamin C supplementation in humans dose-dependently increases the resistance of plasma to ex vivo lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 2004;423:109–115.
175. Victor VM, McCreath KJ, Rocha M. Recent progress in pharmacological research of antioxidants in pathological conditions: Cardiovascular health. *Recent Patents Anti Infect Drug Discov* 2006;1:17–31.
176. Roberts 2nd LJ, Oates JA, Linton MF, Fazio S, Meador BP, Gross MD, Shyr Y, Morrow JD. The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1388–1393.
177. Bocci V, Borrelli E, Corradeschi F, Valacchi G. Systemic effects after colorectal insufflation of oxygen/ozone in rabbit. *Int J Med Biol Environ* 2000;28:109–113.
178. Eliakim R, Karmeli F, Rachmilewitz D, Cohen P, Zimran A. Ozone enema: A model of microscopic colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2001;46:2515–2520.
179. Bocci V, Borrelli E, Valacchi G, Luzzi E. Quasi-total-body exposure to an oxygen–ozone mixture in a sauna cabin. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999;80:549–554.
180. Bocci V, Di Paolo N. Oxygenation–ozonation of blood during extracorporeal circulation (EBOO). Part III: A new medical approach. *Ozone Sci Eng* 2004;26:195–205.
181. Bocci V, Zanardi I, Travagli V, Di Paolo N. Oxygenation–ozonation of blood during extracorporeal circulation: In vitro efficiency of a new gas exchange device. *Artif Organs* 2007;31:743–748.
182. Jacobs MT. Untersuchung über Zwischenfälle und typische Komplikationen in der Ozon-Sauerstofftherapie. *OzonNachrichten* 1982;5:1–5.
183. Rokitanski O, Rokitanski A, Steriner J, Trubel W, Viebahn R, Washu"ttl J. Die Ozontherapie bei peripheren, arteriellen Durchblutungsstörungen; Klinik, biochemische und blutgasanalytische Untersuchungen. In: Wasser IOA, editor. Berlin: Ozon-Weltkongress; 1981. pp 53–75.
184. Rokitanski O. Klinik und Biochemie der Ozontherapie. *Hospitalis* 1982;52:643–647.
185. Matassi R, D'Angelo F, Bisetti P, Colombo R, Vaghi M. Terapia con ozono per via parenterale nelle arteriopatie obliteranti periferiche: Meccanismo biochimico e risultati clinici. *Il Giornale di Chirurgia* 1987;VIII:109–111.
186. Di Paolo N, Bocci V, Salvo DP, Palasciano G, Biagioli M, Meini S, Galli F, Ciari I, Maccari F, Cappelletti F, Di Paolo M, Gaggiotti E. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation (EBOO): A controlled trial in patients with peripheral artery disease. *Int J Artif Organs* 2005;28:1039–1050.
187. De Monte A, van der Zee H, Bocci V. Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. *J Altern Complement Med* 2005;11:363–367.
188. Giunta R, Coppola A, Luongo C, Sammartino A, Guastafierro S, Grassia A, Giunta L, Mascolo L, Tirelli A, Coppola L. Ozonized autohemotransfusion improves hemorheological parameters and oxygen delivery to tissues in patients with peripheral occlusive arterial disease. *Ann Hematol* 2001;80:745–748.
189. Tylicki L, Niewegłowski T, Biedunkiewicz B, Burakowski S, Rutkowski B. Beneficial clinical effects of ozonated autohemotherapy in chronically dialysed patients with atherosclerotic ischemia of the lower limbs—pilot study. *Int J Artif Organs* 2001;24:79–82.
190. Tylicki L, Niewegłowski T, Biedunkiewicz B, Chamienia A, Debska-Slizien A, Aleksandrowicz E, Lysiak-Szydłowska W, Rutkowski B. The influence of ozonated autohemotherapy on oxidative stress in hemodialyzed patients with atherosclerotic ischemia of lower limbs. *Int J Artif Organs* 2003;26:297–303.
191. Clavo B, Pe´rez JL, Lo´pez L, Sua´rez G, Lloret M, Rodr´ıguez V, Mac´ıas D, Santana M, Morera J, Fiuza D, Robaina F, Gu´nderoth M. Effect of ozone therapy on muscle oxygenation. *J Altern Complement Med* 2003;9:251–256.
192. Clavo B, Catala´ L, Pe´rez JL, Rodr´ıguez V, Robaina F. Ozone therapy on cerebral blood flow: A preliminary report. *Evid Based Complement Altern Med* 2004;1:315–319.
193. Tylicki L, Biedunkiewicz B, Niewegłowski T, Chamienia A, Slizien AD, Luty J, Lysiak-Szydłowska W, Rutkowski B. Ozonated autohemotherapy in patients on maintenance hemodialysis: Influence on lipid profile and endothelium. *Artif Organs* 2004;28:234–247.

194. Biedunkiewicz B, Tylicki L, Nieweglowski T, Burakowski S, Rutkowski B. Clinical efficacy of ozonated autohemotherapy in hemodialyzed patients with intermittent claudication: An oxygen-controlled study. *Int J Artif Organs* 2004;27:29–34.
195. Torre-Amione G, Anker SD, Bourge RC, Colucci WS, Greenberg BH, Hildebrandt P, Keren A, Motro M, Moya LA, Otterstad JE, Pratt CM, Ponikowski P, Rouleau JL, Sestier F, Winkelmann BR, Young JB. Advanced chronic heart failure clinical assessment of immune modulation therapy investigators. Results of a non-specific immunomodulation therapy in chronic heart failure (ACCLAIM trial): A placebo-controlled randomised trial. *Lancet* 2008;371:228–236.
196. Cooke ED, Pockley AG, Tucker AT, Kirby JDT, Bolton AE. Treatment of severe Raynaud's syndrome by injection of autologous blood pretreated by heating, ozonation and exposure to ultraviolet light (H-O-U) therapy. *Int Angiol* 1997;16:250–254.
197. Sliwa K, Ansari AA. Immunosuppression as therapy for congestive heart failure. *Lancet* 2008;371:184–186.
198. Fildes JE, Shaw SM, Yonan N, Williams SG. Non-specific immunomodulation in chronic heart failure. *Lancet* 2008;37:2083.
199. Bocci V. Non-specific immunomodulation in chronic heart failure. *Lancet* 2008;37:2083.
200. Bocci V. The failure of the ACCLAIM trial is due to an irrational technology. *Int J Cardiol* 2008, doi:10.1016/j.ijcard.2008.10.001.
201. Olin JW. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study of immune modulation therapy in patients with symptomatic peripheral arterial disease: The SIMPADICO trial. American College of Cardiology 55th Annual Scientific Sessions, Atlanta, GA, March 11–14, 2006. Late-breaking clinical trials I.
202. Owen CG, Fletcher AE, Donoghue M, Rudnicka AR. How big is the burden of visual loss caused by age related macular degeneration in the United Kingdom? *Br J Ophthalmol* 2003;87:312–317.
203. Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr* 2003;23:171–201.
204. Coleman H, Chew E. Nutritional supplementation in age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 2007;18:220–223.
205. Bocci V. Die senile makulopathie und verwandte erkrankungen. In: Viebahn-Haßner R, Knoch HG, editors. *Ozon-Handbuch*. Vol. 5.1. Landsberg, Germany: Ecomed Verlag; 2001. pp 1-26
206. Berson EL, Remulla JF, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C. Evaluation of patients with retinitis pigmentosa receiving electric stimulation, ozonated blood, and ocular surgery in Cuba. *Arch Ophthalmol* 1996;114:560–563.
207. Carpendale MT, Freeberg JK. Ozone inactivates HIV at noncytotoxic concentrations. *Antiviral Res* 1991;16:281–292.
208. Sechi LA, Lezcano I, Nunez N, Espim M, Dupre I, Pinna A, Molicotti P, Fadda G, Zanetti S. Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozon). *J Appl Microbiol* 2001;90: 279-284
209. Church L. Ionozone therapy for skin lesions in elderly patients. *Physiotherapy* 1980;66:50–51.
210. Turcic J, Hancevic J, Antoljak T, Zic R, Alfircic I. Effects of ozone on how well split-thickness skin grafts according to Thiersch take in war wounds. Results of prospective study. *Langenbecks Arch Chir* 1995;380:144–148.
211. Matsumoto A, Sakurai S, Shinriki N, Suzuki S, Miura T. Therapeutic effects of ozonized olive oil in the treatment of intractable fistula and wound after surgical operation. *Proceedings of the 15th Ozone World Congress, Vol. 1, London, UK. London, UK: Speedprint MacMedia; 2001. pp 77–84.*
212. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol* 2005;153:1096–1100.
213. He QC, Tavakkol A, Wietecha K, Begum-Gafur R, Ansari SA, Polefka T. Effects of environmentally realistic levels of ozone on stratum corneum function. *Int J Cosmet Sci* 2006;28:349–357.
214. Zanardi I, Travagli V, Gabbrielli A, Chiasserini L, Bocci V. Physico-chemical characterization of sesame oil derivatives. *Lipids* 2008;43:877–886.
215. Jordan L, Beaver K, Foy S. Ozone treatment for radiotherapy skin reactions: Is there an evidence base for practice? *Eur J Oncol Nurs* 2002;6:220–227.
216. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW, Botek G. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 2005;366:1725–1735.
217. Martı́nez-Sańchez G, Al-Dalain SM, Meneńdez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernáńdez-Montequiń JI, Leoń OS. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005;523:151–161.
218. Barnes PJ. Scientific rationale for inhaled combination therapy with long-acting beta2-agonists and corticosteroids. *Eur Respir J* 2002;19:182–191.
219. Bocci V. May oxygen-ozonotherapy improve the prognosis of BPCO? *Giorn It Mal Tor* 2007;61:434–446.
220. Andreula CF, Simonetti L, De Santis F, Agati R, Ricci R, Leonardi M. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;996–1000.
221. Gallucci M, Limbucci N, Zugaro L, Barile A, Stavroulis E, Ricci A, Galzio R, Masciocchi C. Sciatica: Treatment with intradiscal and intraforaminal injections of steroid and oxygen-ozone versus steroid only. *Radiology* 2007;242:907–913.
222. Oder B, Loewe M, Reisinger M, Lang W, Ilias W, Thurnher SA. CT-guided ozone/steroid therapy for the treatment of degenerative spinal disease-effect of age, gender, disc pathology and multisegmental changes. *Neuroradiology* 2008;50:777–785.

223. Muto M, Ambrosiano G, Guarnieri G, Capobianco E, Piccolo G, Annunziata G, Rotondo A. Low back pain and sciatica: Treatment with intradiscal-intraforaminal O(2)–O(3) injection. Our experience. *Radiol Med* 2008;113:695–706.
224. Wu ZQ, Wei LZ, Li J, Wanga Y, Ni DH, Yang P, Zhang Y. Percutaneous treatment of noncontained lumbar disc herniation by injection of oxygen–ozone combined with collagenase. *Eur J Radiol* 2008, in press. DOI: 10.1016/j.ejrad.2008.07.029.
225. Re L, Marti´nez-Sa´nchez G, Malcangi G, Mercanti A, Labate V. Ozone therapy: A clinical study on the pain management. *Int J Ozone Therapy* 2008;7:37–44.
226. Bochkov VN, Leitinger N. Anti-inflammatory properties of lipid oxidation products. *J Mol Med* 2003;81:613–626.
227. Tamoto K, Yamazaki A, Nochi H, Miura T. Ozonides of olive oil and methyl oleate inhibit the expression of cyclooxygenase 2 through the suppression of kB/NFkB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage-like THP1 cells. *Proceedings of the 17th World Ozone Association Congress, Strasbourg, France, 2005.* p 37.
228. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on microorganisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res* 2000;34:498–501.
229. Azarpazhooch A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent* 2008;36:104–116.
230. Lynch E. *The revolution in dentistry.* Copenhagen: Quintessence Publisher; 2004; 300p.
231. Weaver LK, Hopkins RO, Chan KJ, Churchill S, Elliott CG, Clemmer TP, Orme Jr JF, Thomas FO, Morris AH. Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med* 2002;347:1057–1067.
232. Cianci P. Advances in the treatment of the diabetic foot: Is there a role for adjunctive hyperbaric oxygen therapy? *Wound Repair Regen* 2004;12:2–10.
233. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: Its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM* 2004;97:385–395.
234. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007;13:688–694.
235. Wood KC, Gladwin MT. The hydrogen highway to reperfusion therapy. *Nat Med* 2007;13: 673–674.
236. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H<sub>2</sub>S as a physiologic vasorelaxant: Hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 2008;322:587–590.

**Velio Bocci**, M.D., Ph.D., in Physiology. He is an Emeritus Professor of Physiology at the University of Siena, Italy. His main research fields are plasma proteins characterization and labelling; metabolism and pharmacokinetics of interferons and cytokines; biological and medical evaluation of oxygen– ozone therapy.

**Emma Borrelli**, M.D., Ph.D., in Cardiovascular Pathophysiology. She is the Director of the Laboratory of Cardiovascular pathology in the Department of Surgery and Bioengineering of the University of Siena, Italy. Her research interest deals with cardiovascular pathology and the application of ozone therapy.

**Valter Travagli** is an Associate Professor of Pharmaceutical Technology at the University of Siena, Italy. His main research fields are the interactions of biological macromolecules with degrading agents and the inner Quality concept for drugs, based on manufacturing processes.

**Iacopo Zanardi**, Ph.D., in Pharmaceutical Sciences, Department of Pharmaceutical Chemistry and Technology, University of Siena, Italy. His main research fields are the chemico-physical evaluation of biological macromolecules and ozone therapy.