

## L'OSSIGENO OZONOTERAPIA MEDIANTE AUTOEMOINFUSIONE DI SANGUE OZONIZZATO INDUCE UN MIGLIORAMENTO DEL METABOLISMO CEREBRALE NEI PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI MULTIPLA.

F. MOLINARI<sup>1</sup>, V. SIMONETTI<sup>2</sup>, M. FRANZINI<sup>3</sup>, S. PANDOLFI<sup>3</sup>, F. VAIANO<sup>3</sup>,  
L. VALDENASSI<sup>3</sup> e W. LIBONI<sup>4</sup>

*Biolab, Dipartimento di Elettronica e Telecomunicazioni, Politecnico di Torino<sup>1</sup>;  
Fondazione Onlus KAOS, Torino<sup>2</sup>;*

*Società Italiana di Ossigeno e Ozono Terapia, Bergamo<sup>3</sup>;  
Fondazione Onlus "Un Passo Insieme", Torino<sup>4</sup>*

*Ricevuta il 26 Marzo 2014 – Accettata il 30 Giugno 2014*

L'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato è una tecnica terapeutica emergente che sta ottenendo sempre maggiore importanza nel trattamento dei disturbi neurologici. Uno studio scientifico per valutare l'effetto di tale terapia sul metabolismo e sulla circolazione cerebrale non è stato mai effettuato. Abbiamo deciso di utilizzare la spettroscopia NIRS che sfrutta la luce appartenente allo spettro del vicino infrarosso (Near Infra Red Spectroscopy) per monitorare il metabolismo cerebrale ed il doppler trans-cranico (TCD) per monitorare la velocità del flusso sanguigno nella arteria cerebrale media. Abbiamo trattato con ossigeno ozono terapia tramite autoemoinfusione di sangue ozonizzato 54 soggetti (32 pazienti neurologici e 22 controlli) che sono stati testati prima, durante e dopo l'autoemoinfusione di sangue ozonizzato. Abbiamo monitorizzato le variazioni di concentrazione del livello di emoglobina ossigenata e desossigenata, e del livello della citocromo-c-ossidasi (CYT-c). Come primo obiettivo del lavoro abbiamo dimostrato i cambiamenti del metabolismo cerebrale e della circolazione di tutti i soggetti arruolati nello studio. La concentrazione di emoglobina ossigenata è aumentata dopo la reinfusione del sangue ozonizzato ed è rimasta più alta rispetto ai valori iniziali per un'altra ora e mezza dopo la fine del trattamento. La concentrazione di emoglobina desossigenata è diminuita durante la terapia e la concentrazione della citocromo-c-ossidasi è aumentata significativamente circa un'ora dopo la reinfusione di sangue ozonizzato. Non sono stati osservati cambiamenti significativi nella velocità del flusso sanguigno. Come secondo obiettivo abbiamo confrontato i dati del metabolismo cerebrale estrapolati con la NIRS dai 20 pazienti affetti da sclerosi multipla recidivante remittente con quelli dei 22 soggetti sani. Abbiamo dimostrato che utilizzando solo 7 variabili NIRS è stato possibile caratterizzare lo stato metabolico del cervello dei due gruppi di soggetti. I pazienti con Sclerosi Multipla hanno mostrato un aumento rilevante dell'attività e della concentrazione di CYT-c circa 40 minuti dopo l'autoemoinfusione di sangue ozonizzato, forse rivelando una riduzione del livello di stress ossidativo cronico tipico dei malati di SM. Da un punto di vista scientifico, questo studio preliminare ha dimostrato come lo spettroscopio a tecnologia NIRS potrebbe essere utile per mostrare gli effetti dell'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato a livello cerebrale, in un monitoraggio a lungo termine. Il risultato biochimico di questo studio è la misurazione quantitativa dei cambiamenti del livello di CYT-c nei pazienti con Sclerosi Multipla indotta dall'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione.

*Parole chiave: ossigeno ozonoterapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato, Spettroscopia nel vicino-infrarosso, doppler transcranico, reazione cerebrovascolare, analisi tempo-frequenza, MANOVA, citocromo-c-ossidasi.*

Recenti studi hanno mostrato l'effetto dell'autoemoinfusione di sangue ozonizzato nella cura delle malattie vascolari (1), delle ferite (2), della maculopatia degenerativa della retina (3), delle patologie vascolari ischemiche degli arti inferiori (PAD) e nei pazienti in dialisi (4). Gli studi scientifici menzionati precedentemente hanno dimostrato le capacità

dell'ozono di migliorare l'ossigenazione dei tessuti periferici. Nel 2013, Pecorelli e al. (5) hanno dimostrato il meccanismo secondo il quale un siero ozonizzato è in grado di stabilizzare l'eme-ossigenasi-1 nelle cellule dell'endotelio; ciò fornisce una potenziale applicazione terapeutica nelle patologie aggravate da uno stress ossidativo cronico.

Una particolare attenzione è stata data alla possibilità di utilizzare l'ossigeno-ozono terapia in neurologia, in modo da migliorare l'ossigenazione cerebrale (1) e di ridurre lo stress ossidativo cronico (6). Gravi disturbi neurologici su base degenerativa, cioè su danni degenerativi ai neuroni sono correlati ad un ridotto apporto di ossigeno ai tessuti del cervello associato ad un'insufficienza venosa cronica (7). Nonostante in studi relativi alla sclerosi multipla (MS) la presenza di un'insufficienza cerebrale venosa cronica sia stata discussa (8), evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'aumento della circolazione venosa cerebrale ( per via angioplastica transluminale percutanea ) ha portato ad una riduzione delle recidive in soggetti affetti da SM e ad un miglioramento delle loro condizioni cliniche generali (7). Quindi, soprattutto, la circolazione cerebrale ed il livello di ossigeno sembrano giocare un ruolo importante nella progressione e nella manifestazione della sintomatologia della Sclerosi Multipla (SM).

Oltre ad aumentare il livello di ossigenazione nei tessuti, l'ossigeno-ozono terapia è conosciuta perché aumenta l'attività metabolica delle cellule e riduce lo stato infiammatorio generale (6).

Questo effetto anti-infiammatorio potrebbe essere particolarmente utile nel trattamento delle patologie croniche autoimmuni, come la SM. Si è supposto che le lesioni della materia bianca, solitamente riscontrate nelle immagini di risonanze magnetiche nei soggetti affetti da SM, possano essere correlate ad un aumento dello stress ossidativo cronico (9). Allo stesso tempo, l'aumento cronico del livello delle specie reattive dell'ossigeno, potrebbe essere correlato ad una ridotta attività metabolica dei mitocondri nelle cellule. Da qui, l'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato potrebbe essere di aiuto per trattare pazienti con SM, soprattutto per il suo effetto di aumento dell'attività mitocondriale. Precedenti studi hanno provato a quantificare l'effetto della ossigeno-ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato considerando principalmente le reazioni biochimiche (6) ed i cambiamenti vascolari (4), ma manca ancora un protocollo in-vivo di valutazione, uniforme e standardizzato, di tali effetti sul tessuto cerebrale. Lo spettroscopia NIRS che sfrutta la luce appartenente allo spettro del vicino infrarosso, Near Infra Red Spectroscopy (NIRS) è una tecnica non-invasiva che consente il monitoraggio in tempo reale delle variazioni di concentrazione nel cervello di emoglobina ossigenata (O<sub>2</sub>Hb) e ridotta (HHb). Inoltre, lo spettroscopio NIRS misura il cambiamento nella concentrazione della Citocromo-c-ossidasi (CYT-c). La CYT-c è un enzima coinvolto nella catena della respirazione cellulare e quindi è coinvolto

nella produzione di energia nella cellula, nello specifico a livello mitocondriale (10).

In questo studio, abbiamo usato la tecnica NIRS per monitorare gli effetti a lungo termine della ossigeno-ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato in soggetti neurologici. La durata complessiva del monitoraggio è stata di circa 2 ore e mezza. Il nostro obiettivo principale è stato quello di concentrarci sugli effetti a lungo termine dell'ossigeno-ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato, perché volevamo evitare l'ovvio ed evidente immediato aumento di saturazione di ossigeno nel sangue causato dalla ossigenazione e ozonizzazione tramite l'autoemoinfusione durante il trattamento.

Come secondo obiettivo della sperimentazione, abbiamo studiato i dati dei pazienti affetti da SM e li abbiamo comparati con i dati ricavati dai soggetti sani. Dal momento che il contenuto spettrale dei segnali del NIRS contiene l'informazione riguardo la reattività vasomotoria cerebrale (11-13), abbiamo studiato i segnali nel dominio tempo-frequenza. Sono state usate due vie ANOVA e variabili ANOVA (MANOVA) per studiare le differenze degli effetti della ossigeno-ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato tra i pazienti ed i controlli, e particolarmente per evidenziare gli effetti dell'ozono sul metabolismo cerebrale. Al meglio delle nostre conoscenze, questo studio è il primo che indaga gli effetti sul metabolismo cerebrale a lungo termine dell'ozono terapia in pazienti neurologici.

## MATERIALI E METODI

### *Setup sperimentale*

Il protocollo dell'ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato consiste nel prelievo di 240 gr di sangue integro da una vena brachiale dei soggetti. Successivamente il sangue viene mixato con 180 ml di O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub>, composto da O<sub>2</sub> al 50%, con una concentrazione di O<sub>3</sub> pari a 40 µg/ml (M95, Multiossigeno, Gorle (BG), Italia). Il sangue ozonizzato è stato poi re-iniettato nella stessa vena brachiale. Il segnale generale di registrazione del protocollo, quindi, consiste in:

- a) Rilevazione iniziale di base (durata media 258–58 s);
- b) Prelievo del sangue ed ozonizzazione (326-154 s);
- c) Reinfusione del sangue ozonizzato (1520-804 s);
- d) Monitoraggio post-reinfusione (1,5 ore).

Le registrazioni del NIRS sono state eseguite con un apparecchiatura commerciale (NIRO200, Hamamatsu Photonics K.K., Japan), con un set di frequenza di campionamento di 2 Hz. La sonda dello spettroscopio NIRS era formata da un fotorivelatore

e quattro sorgenti LED ad infrarossi (lunghezze d'onda pari a 775,810,830 e 910 nm) ed è stata posizionata sulla fronte del soggetto 2 cm distante dalla linea mediana e 1 cm al di sopra della cresta sopra orbitale (11). Durante tutti i tests, è stato chiesto ai soggetti di rimanere in posizione supina, in una stanza tranquilla respirando regolarmente e con gli occhi chiusi, in modo da evitare il più possibile ogni stimolazione vaso-attiva esterna.

Durante la terapia, abbiamo misurato anche la velocità del flusso sanguigno cerebrale della arteria cerebrale media dei soggetti per mezzo di un apparecchio a doppia sonda, Doppler Transcranico (TCD) (Delica EMS-9UA, Shenzhen Delicate Electronics Co., Ltd - China) dotata di sonde da 2 MHz. Le sonde sono state posizionate in modo da studiare il tratto M1 dell'arteria cerebrale media (ACM). Il TCD trasmette informazioni riguardanti la velocità del flusso sanguigno nelle maggiori arterie cerebrali, il quale è collegato ai cambiamenti sistemici della pressione sanguigna e la susseguente reazione vasomotoria (14). Tuttavia, la penetrazione degli ultrasuoni nel cranio è altamente dipendente dalla finestra ossea individuale (14).

Così, in circa il 25% dei soggetti il segnale TCD è troppo debole o troppo rumoroso per essere utilizzato tranquillamente per valutare i cambiamenti vasomotori. In studi precedenti, abbiamo adottato un sistema di monitoraggio comune dove utilizzavamo contemporaneamente il NIRS e il TCD. Il vantaggio di utilizzare le due metodologie contemporaneamente è che il TCD è più accurato nel captare i piccoli cambiamenti nelle variabili emodinamiche cerebrali (15), mentre il NIRS fornisce informazioni metaboliche e funzionali (11,16).

Sono anche stati monitorati la saturazione sistemica dell'ossigeno e la pressione sanguigna arteriosa.

*Dati dei pazienti e dei soggetti sani che hanno partecipato allo studio.*

Dopo essere stati informati riguardo le procedure generali ed aver firmato un consenso informato scritto, 54 soggetti sono stati sottoposti all'ozono-autoemoterapia. I tests sono stati effettuati tra Maggio 2012 e Febbraio 2013.

Letà media dei soggetti era di 64.7-3.5 anni (gam-

ma di 26 - 72 anni). Venti soggetti erano donne. Il campione della popolazione consisteva in 22 soggetti affetti da SM remittente-ricidivante, 10 affetti da altri disturbi neurologici (2 pazienti affetti dal Parkinson, 6 soggetti emicranici, e 2 soggetti idrocefalici), e 22 volontari in buona salute.

Per sperimentare il secondo obiettivo dello studio abbiamo confrontato gli effetti della ossigeno-ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato tra i soggetti sani e i pazienti affetti da sclerosi multipla, abbiamo selezionato un sottogruppo di 20 soggetti (10 sani e 10 malati di SM). Abbiamo escluso tutti i soggetti che avevano una qualità insufficiente dei segnali acquisiti (sia con NIRS che con TCD), coloro che hanno interrotto la registrazione dei controlli e non hanno concluso il monitoraggio, e coloro che hanno mostrato un aumento eccessivo della pressione sanguigna arteriosa durante la trasfusione. La Tabella I riassume i dati anagrafici del paziente per questo sotto gruppo.

*Elaborazione del segnale per valutare il primo obiettivo dello studio: valutazione delle modificazioni del metabolismo e del flusso sanguigno cerebrale nei soggetti arruolati nella sperimentazione.*

Abbiamo indagato i segnali acquisiti in 8 differenti intervalli di tempo, della durata ciascuno di 256 secondi.

Questi 8 intervalli di analisi sono state presi in corrispondenza di:

- I) RegISTRAZIONI di base
- II) Prelievo di sangue
- III) Metà del periodo di reiniezione
- IV) Fine (ultimo di 256 s) della reiniezione
- V) 20 minuti dopo la reiniezione
- VI) 40 minuti dopo la reiniezione
- VII) 1 ora dopo la reiniezione
- VIII) 1 ora e mezza dopo la reiniezione

Abbiamo selezionato questi intervalli perché volevamo monitorare ogni specifica fase dell'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione. Per ogni intervallo e per ogni paziente, abbiamo eseguito un'analisi delle serie temporali dei segnali, attraverso una media dei valori del segnale in ognuno degli intervalli di osservazione. Ciò ci ha portati a calcolare le velocità medie del flusso sanguigno (tramite i segnali del

**Tabella I.** Dati anagrafici del paziente

	Soggetti Sani	Soggetti con SM
Numero dei Soggetti (# femmine)	10 (6)	10(4)
Età (anni)	65.4±3.7	38.0±3.8
BMI (Kg/m <sup>2</sup> )	25.6±2.7	24.2±3.5

TCD) durante tutto il protocollo ed i cambiamenti delle concentrazioni di emoglobina nel tessuto cerebrale (tramite i segnali del NIRS). Abbiamo analizzato i seguenti 4 segnali NIRS: O<sub>2</sub>Hb, HHb, CYT-c, e l'Indice di Ossigeno nel Tessuto (TOI). Il TOI è definito come il rapporto tra l' O<sub>2</sub>Hb e l' emoglobina totale (O<sub>2</sub>Hb + HHb). Inoltre, abbiamo analizzato la velocità del flusso sanguigno di destra e di sinistra nelle arterie cerebrali medie.

In generale, abbiamo avuto 48 variabili dall'analisi delle serie temporalidi ogni soggetto ( i.e. 6 segnali in 8 intervalli di osservazione).

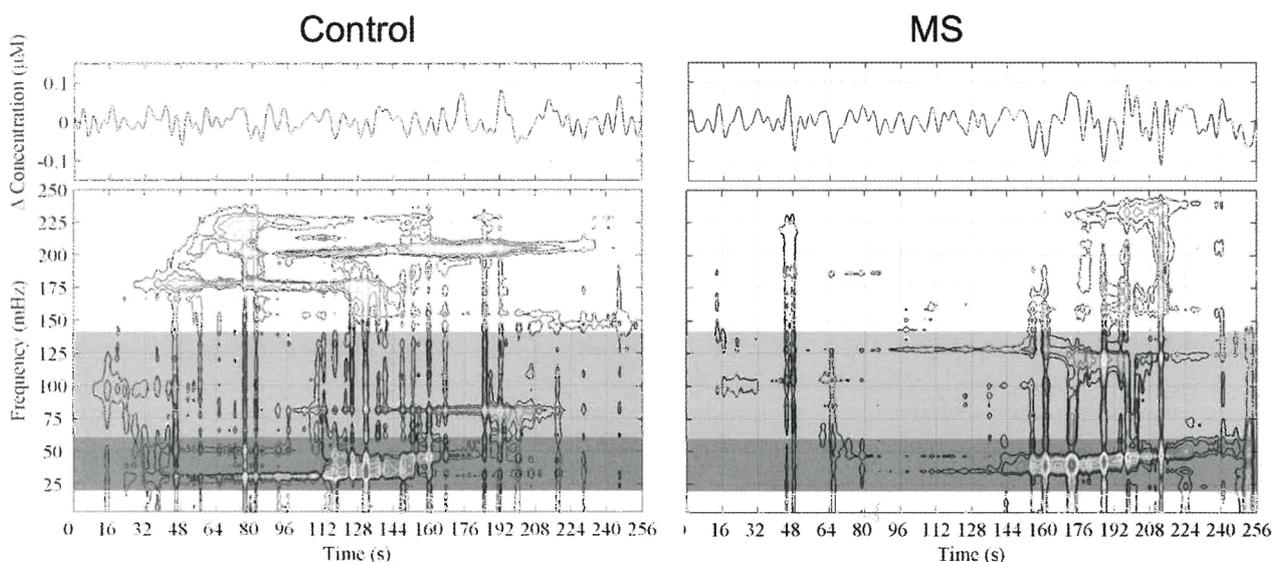
*Elaborazione del segnale per valutare il secondo obiettivo dello studio: effetti della ossigeno-ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato nei soggetti sani e nei pazienti affetti da sclerosi multipla.*

I segnali NIRS sono stati ulteriormente analizzati con un approccio tempo-frequenza (TF). Infatti è stato già dimostrato che i segnali cerebrali NIRS sono caratterizzati da una marcata instabilità (12,17). L'analisi tempo-frequenza è stata fatta mediante la distribuzione Choi-Williams (CW) della classe di Cohen ( con  $\sigma = 0.5$  )(18).Attraverso la CW, abbiamo misurato le potenze di segnale in due bande di frequenza: Frequenza molto bassa (VLF: 20mHz – 60mHz) e bassa frequenza (LF:60mHz-140mHz). Inoltre abbiamo misurato la potenza totale del segnale(PTOT) per i 4 segnali. Per esempio, la fig.1 mostra il segnale CYT-c durante l'osservazione nell'intervallo VI in entrambi i parametri del tempo ed del tempo-frequenza .La banda VLF è riferita

alla reazione vasomotoria a lungo termine, mentre la banda LF è riferita all'attività del sistema simpatico e, da qui, all'autoregolazione cerebrale (12,19,20). Dalla potenza delle bande VLF e LF, abbiamo poi calcolato le percentuali relative delle potenze  $P_{VLF}/P_{TOT}$  e  $P_{LF}/P_{TOT}$  per tutti i segnali (i.e. O<sub>2</sub>Hb, HHb, CYT-c e TOI), in tutti e 8 gli intervalli di analisi e per tutti i soggetti - campione della popolazione. Così, abbiamo calcolato 96 variabili usando l'analisi tempo-frequenza. Considerando le 32 variabili derivate dall'analisi dei parametri di tempo dei segnali NIRS (i.e. quattro segnali in otto intervalli), il numero totale delle variabili è diventata di 128 per soggetto.

Lo scopo del nostro secondo obiettivo è stato quello di trovare le variabili più importanti che caratterizzano i dati ottenuti con la tecnologia NIRS sia su pazienti affetti da SM che su soggetti sani.

Il processo di funzionalità di selezione ed estrazione è essenziale quando si ha a che fare con sistemi caratterizzati da un alto numero di dati e di possibili ridondanze (21,22). Quindi, come primo passo, abbiamo eliminato le variabili collineari, come suggerito dagli studi precedenti (23). Il numero delle variabili è stato ridotto mediante un'equilibrata ANOVA mono-direzionale tra ognuna delle variabili dipendenti e le patologie dei soggetti ( considerate come variabile indipendente). Quando una variabile registra un valore-p uguale o minore di 0.01 lo consideriamo significativo. Per il resto del lavoro, abbiamo utilizzato le restanti 17 variabili, come riportato in Tabella II.



**Fig.1** Rappresentazione dell'andamento nel tempo ( riquadro superiore) e del tempo-frequenza del segnale della citocromo-c-ossidasi nei soggetti sani (riquadro di sinistra) e nei pazienti con SM (riquadro di destra).La zona grigio scuro raffigura la banda VLF (20-60 mHz), la zona grigio chiaro la banda LF ( 60-140 mHz).

Riduzione variabile e analisi con supervisione/senza supervisione per elaborare i dati relativi al secondo obiettivo della sperimentazione.

**Tabella II.** Variabili significative dopo l'analisi ANOVA.

Variabile	Intervallo di osservazione
Media O <sub>2</sub> Hb	II, IV, V, VI, VII, VIII
Media CYT-c	II, III, VI, VII, VIII
P <sub>VLF</sub> CYT-c	I, VI
P <sub>LF</sub> CYT-c	I, VI
P <sub>TOT</sub> CYT-c	I, VI

Le prime due righe riportano le variabili relative al dominio del tempo. Le ultime tre righe riportano le variabili relative al dominio tempo-frequenza.

Per discriminare queste variabili responsabili della maggior parte della variazione totale abbiamo utilizzato un lambda test di Wilks sulle variabili ridotte come da equazione seguente:

$$\Lambda = \frac{|W|}{|B|+|W|}$$

Qui la  $|W|$  è la determinante della matrice della variante interna al gruppo, mentre  $|B|$  è la determinante della matrice della variante tra i gruppi. Come conseguenziale variabili con la  $\Lambda$  minore sono state scelte come le più adatte per una classificazione dei soggetti in due differenti gruppi. Per mezzo di una analisi MANOVA, abbiamo ottenuto una combinazione lineare delle variabili disponibili, per classificare i soggetti utilizzando un solo parametro. La Tabella III riporta le 7 variabili che hanno mostrato un valore  $\Lambda$  minore di 0.01.

**Tabella III** Le sette variabili più importanti per il sistema MANOVA

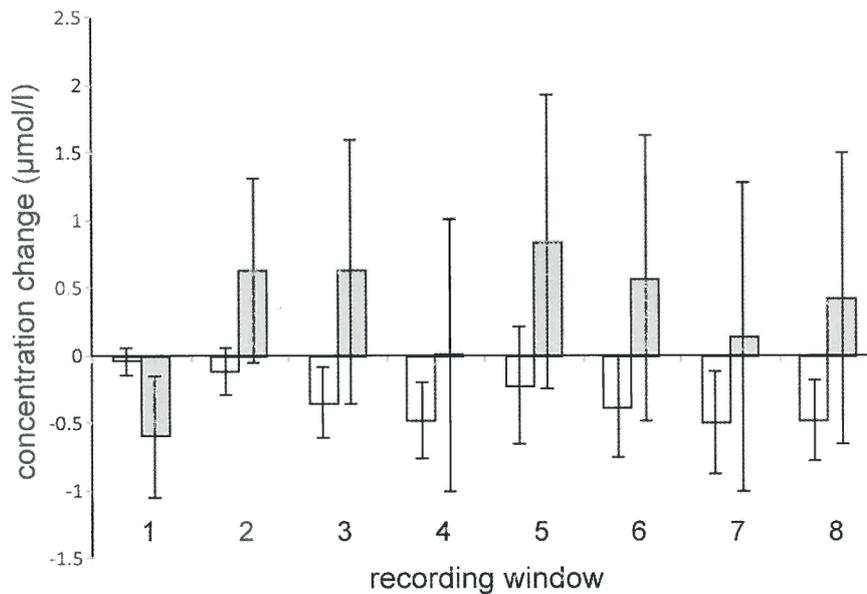
#### DOMINIO DEL TEMPO

Variabile	Intervallo di osservazione
Media O <sub>2</sub> Hb	II
Media CYT-c	II, VIII

#### DOMINIO DEL TEMPO-FREQUENZA

Variabile	Intervallo di osservazione
P <sub>VLF</sub> CYT-c	I, VI
P <sub>LF</sub> CYT-c	I, VI
P <sub>TOT</sub> CYT-c	I, VI

Dal significato di queste sette variabili è possibile solamente raggruppare i soggetti sani ed i pazienti affetti da SM R-R.



**Fig.2** Cambiamenti della concentrazione di O<sub>2</sub>Hb (colonne grigie) e di HHb (colonne bianche) negli otto intervalli di osservazione. Questi grafici sono relativi ad una media temporale del segnale nei rispettivi intervalli per tutti i soggetti. Le linee verticali rappresentano l'errore standard: Un aumento di O<sub>2</sub>Hb si osserva a partire dal 5° intervallo, mentre l'HHb decresce lungo gli intervalli.

## RISULTATI

Primo obiettivo: effetti a lungo-termine dell'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato sul tessuto cerebrale.

Il NIRS può misurare solo una relativa concentrazione (un cambiamento di concentrazione) di un cromoforo; quindi, tutti i segnali sono stati posizionati in una scala di referenza di valore zero all'inizio della registrazione dei dati. Partendo dal 5° intervallo (circa 20 minuti dopo la fine della re-iniezione), l'O<sub>2</sub>Hb ha mostrato un notevole incremento. La concentrazione di O<sub>2</sub>Hb negli intervalli dal 5° all'8° è stata statisticamente più alta di quella nel primo intervallo (Student t-Test;  $p < 0.05$ ). La concentrazione di HHb è diminuita dall'inizio del protocollo e a partire dal 3° intervallo essa era più bassa dell'inizio ( $p < 0.05$ ). Poi, la concentrazione di HHb è diminuita fino alla fine del monitoraggio. La Fig.2 mostra la media dei cambiamenti della concentrazione di O<sub>2</sub>Hb e HHb durante l'intero protocollo.

Il TOI è diminuito durante il prelievo di sangue (2° intervallo) e poi progressivamente ha recuperato la sua linea di base durante il monitoraggio (Fig.3)

La concentrazione di CYT-c risulta aumentata palesemente nel 7° intervallo (un'ora dopo la fine del monitoraggio)(Fig.3B).Questo aumento non è collegato all'aumento del livello di ossigenazione, dato che l'aumento di O<sub>2</sub>Hb comincia ad aumentare dal 5° intervallo.

Nella sub sezione successiva, relativamente all'en-

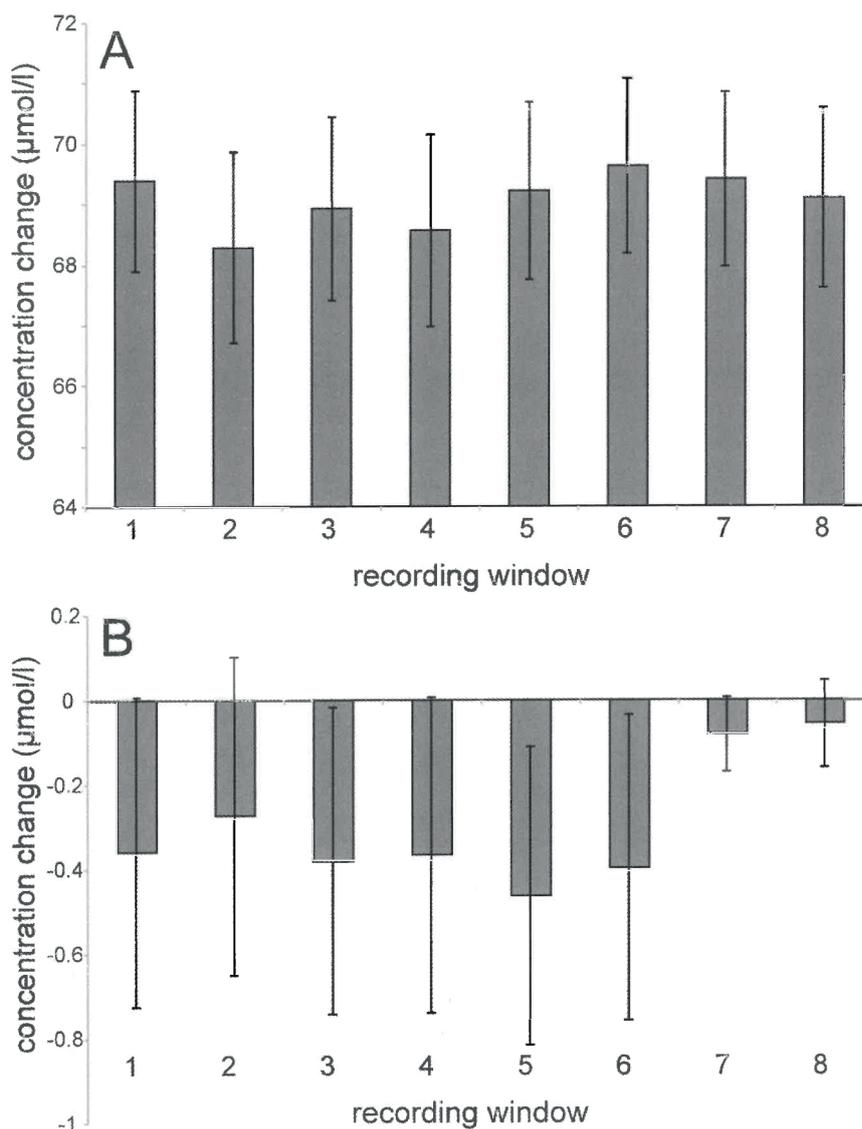
dpoint secondario, noi osserveremo successivamente l'importanza dei cambiamenti della CYT-c nei pazienti con SM.

I valori medi della velocità del flusso sanguigno cerebrale nelle arterie medie cerebrali sono illustrati nelle Fig.4A (lato destro) e nella Fig.4B (lato sinistro). Entrambi i grafici mostrano un moderato incremento della velocità del flusso sanguigno, che è leggermente superiore nell'emisfero sinistro dell'encefalo. Comunque, nessuno dei valori del flusso sanguigno è stato significativamente differente dal valore iniziale del 1° intervallo.

In questo caso, abbiamo mirato a documentare specifici cambiamenti dei dati del metabolismo cerebrale di pazienti con SM R-R quando comparati con soggetti sani.

Abbiamo considerato solo i dati del NIRS, poiché le velocità del flusso sanguigno non mostravano alcuna differenza tra i due gruppi. Nell'ordine di scoprire qualche differenza nei risultati dei due gruppi, abbiamo indagato sulla fonte di variazione nei dati impostati dell'ANOVA a due vie.

Abbiamo focalizzato l'ANOVA su entrambi le variazioni generate dai vari soggetti (Malati di SM e soggetti sani) e le variazioni generate dai differenti intervalli di osservazione. I valori-p ottenuti erano tutti al di sotto dello 0.01 quindi abbiamo scartato i tre differenti ipotesi nulle (tutti i pazienti provenienti dalla stessa popolazione, tutti gli intervalli di osservazione relativi alla stessa popolazione, e non ci fu al-

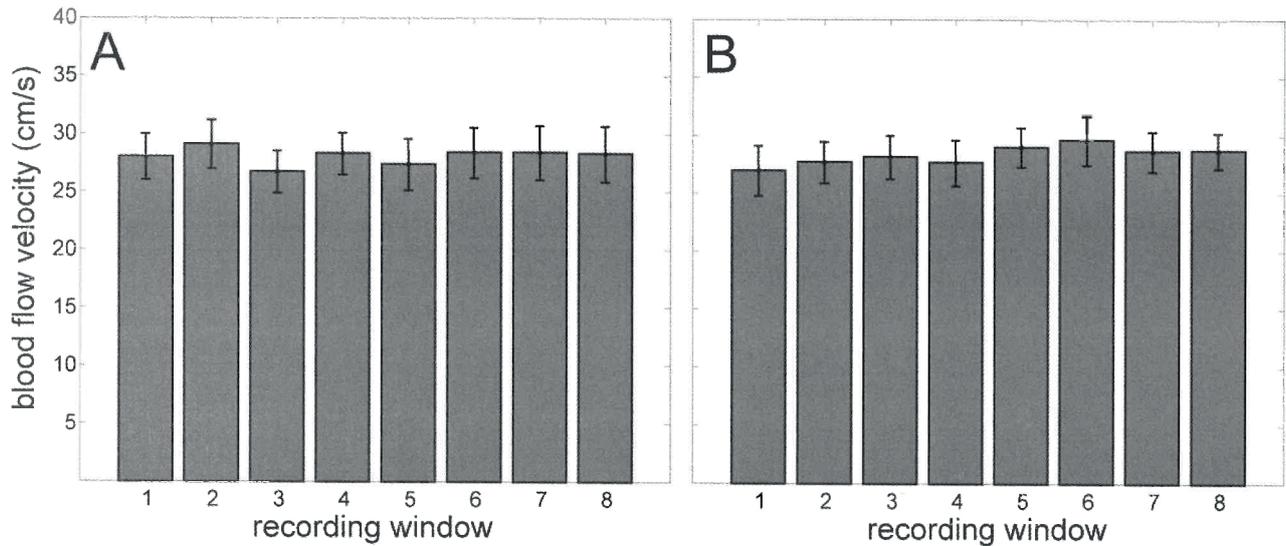


**Fig.3** Cambiamenti della concentrazione di TOI (riquadro A) e di CYT-c (riquadro B) negli otto intervalli di osservazione. Il TOI diminuisce durante il prelievo di sangue (2° intervallo) e poi risale fino a tornare ai valori normali. La CYT-c aumenta marcatamente nel 7° intervallo (un'ora dopo la fine della reiniezione di sangue).

cuna relazione tra il gruppo di pazienti e l'intervallo).

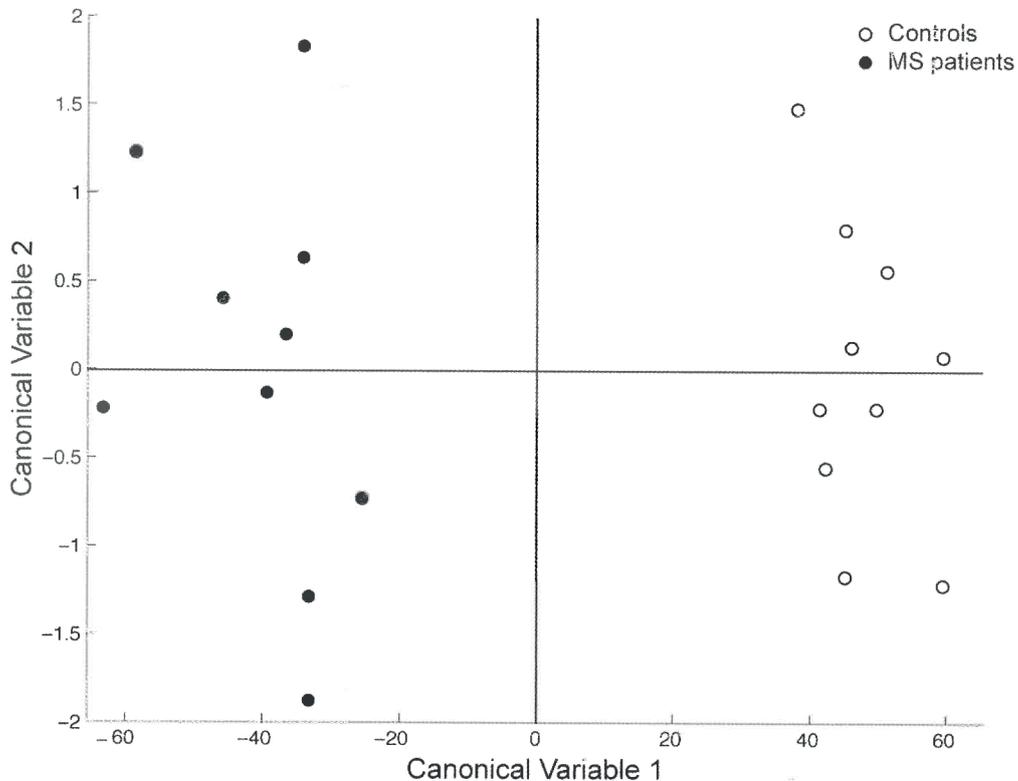
Il MANOVA ha mostrato che la dimensione dello spazio contenente le medie del gruppo era uguale a uno, i soggetti dipendenti da due gruppi ed è stato possibile differenziare i soggetti attraverso una singola variabile canonica. La rappresentazione dei soggetti in funzione delle prime due variabili canoniche è riportata in FIG.5 Si può osservare che i soggetti sono nettamente separati. Quindi, usando le 7 variabili derivanti dal NIRS (riportate in tabella III), è possibile differenziare i pazienti di SM dal controllo poiché essi mostrano un modello metabolico differente. Delle 7 variabili che risultarono discriminanti, tre furono elaborate nella serie temporale e quattro nella serie tempo-frequenza (Tabella III). Le tre va-

riabili discriminanti elaborate nella serie temporale erano le concentrazioni di O<sub>2</sub>Hb e CYT-c durante il prelievo di sangue (2° intervallo) e la concentrazione di CYT-c alla fine del monitoraggio (8° intervallo), dopo un'ora e mezza dalla reiniezione di sangue. Le 4 variabili discriminanti restanti furono tutte elaborate nella serie tempo-frequenza ed erano tutte relative al segnale CYT-c. Tre di queste erano la potenza del segnale della CYT-c nelle bande VLF e LF e la potenza totale del segnale registrato nel 6° intervallo del protocollo, che era quello di 40 minuti dopo la reiniezione. Tutte le variabili erano statisticamente differenti tra i due gruppi (Student t-Test;  $p < 0.05$ ). La Tabella IV sintetizza i valori principali delle variabili nei due gruppi.



**Fig.4** Cambiamenti della velocità del flusso sanguigno nell'arteria cerebrale media di destra ( riquadro A) e in quella di sinistra ( riquadro B) durante gli otto intervalli di osservazione. Non sono osservabili cambiamenti significativi.

Secondo obiettivo: effetti della ossigeno-ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato nei soggetti sani e nei pazienti affetti da sclerosi multipla.



**Fig.5** Rappresentazione dei soggetti sani (pallini bianchi) e dei pazienti con SM R-R (pallini neri) nel piano della prima e seconda variabile canonica così come rappresentato dal sistema MANOVA. I soggetti sani sono chiaramente separati dai pazienti con SM. Una singola variabile (la prima variabile canonica) è sufficiente per creare una distinzione tra i due gruppi.

**Tabella IV** Valore medio delle 7 variabili discriminanti della Tabella III nel gruppo dei soggetti sani e dei pazienti con SM (valore medio  $\pm$  deviazione standard)

Variabile	Soggetti Sani	Pazienti con SM
Media O <sub>2</sub> Hb II	-0.66 $\pm$ 0.51	1.99 $\pm$ 1.22
Media CYT-c II	0.08 $\pm$ 0.05	-0.19 $\pm$ 0.12
Media CYT-c VIII	0.00 $\pm$ 0.20	-0.41 $\pm$ 0.13
P <sub>VLF</sub> CYT-c I	0.02 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01
P <sub>VLF</sub> CYT-c VI	0.02 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01
P <sub>LF</sub> CYT-c VI	0.06 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.02
P <sub>TOT</sub> CYT-c VI	0.14 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.04

Tutte le variabili risultarono statisticamente differenti tra i due gruppi (Student's *t*-test;  $p < 0.05$ ).

#### DISCUSSIONE

In questo studio, abbiamo mostrato gli effetti a lungo termine a livello cerebrale dell'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato su un gruppo di 50 soggetti. Per sperimentare il nostro primo obiettivo, abbiamo monitorato i soggetti per circa 3 ore usando lo spettroscopio NIRS ed il TCD. Questo ci ha portato a monitorare congiuntamente i cambiamenti metabolici nel tessuto cerebrale (NIRS) e la velocità del flusso sanguigno nella circolazione cerebrale (TCD). Entrambe le tecniche, NIRS (16) e TCD (14), sono già state usate congiuntamente per valutare meglio la funzionalità metabolica e neurovascolare in modo non-invasivo (24,25). Entrambe le tecniche monitorano una risposta funzionale (11,13,26) che, in questo protocollo sperimentale, potrebbero essere d'aiuto per capire meglio l'effetto a livello cellulare dell'ozono, soprattutto nei pazienti affetti da SM.

Nel 2004, Clavo ed altri scoprirono che ripetendo l'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato aumentava la velocità sistolica del flusso sanguigno cerebrale del 15% dopo una settimana (3 sedute in una settimana) (27). I nostri dati del TCD non hanno messo in evidenza una significativa variazione del flusso sanguigno cerebrale durante il protocollo. Comunque, la quantità totale di ozono iniettato è stata inferiore ad 1/3 di quella che Clavo ed altri usarono durante una settimana di terapia. Nonostante tutto, abbiamo registrato un moderato, anche se non significativo, aumento della velocità del flusso sanguigno nei lobi cerebrali di sinistra. Facendo un'ipotesi, tale aumento più marcato nella parte sinistra poteva essere correlato al lato dominante dei soggetti, dal momento che circa l'84%

dei soggetti era destrorso. Comunque, successive analisi sono necessarie per valutare i cambiamenti emodinamici nella circolazione cerebrale dopo l'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato. Che noi sappiamo, non esistono altri studi che dimostrino l'evidenza della concentrazione di ossigeno nella corteccia cerebrale dopo l'ozono autoemoterapia. Il più evidente effetto metabolico è l'aumento marcato di CYT-c un'ora dopo la fine della reiniezione di sangue. Questo risultato è in linea con gli studi riguardanti l'invecchiamento, nei quali è stato dimostrato che la somministrazione del mix di O<sub>2</sub>/O<sub>3</sub> ha migliorato le alterazioni cerebrocorticali correlate all'età, inclusa l'attività del complesso IV (CYT-c) (28).

Riguardo al nostro secondo obiettivo, abbiamo considerato il diverso modello metabolico in risposta all'ossigeno ozono terapia effettuata su un gruppo di pazienti affetti da SM R-R comparati con un gruppo di volontari sani. I nostri risultati hanno dimostrato che l'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato ha un chiaro effetto nel segnale di innesco della CYT-c, specialmente sui pazienti con SM. I livelli di CYT-c nei pazienti con SM sono inferiori rispetto a quelli dei soggetti sani a causa del danno mitocondriale caratteristico della SM, ed i nostri risultati in-vivo confermano tale scoperta (29). Uno studio precedente ha ipotizzato la presenza di un danno ossidativo al DNA in associazione con un'inflammatione delle placche attive del cranio, che sono i tipici danni della materia bianca associati alla SM (9). Lo stesso studio ha mostrato come il danno ossidativo si sviluppasse in associazione ad un'inflammatione del sistema nervoso centrale, e come possa contribuire ad un declino del metabolismo energetico nelle cellule malate. Di con-

sequenza, ci sarebbe dovuto essere un decremento di produzione di CYT-c nei pazienti con SM dovuto dall'infiammazione indotta dallo stress ossidativo. In un recente studio, Sagai e altri hanno dimostrato che l'ozono induce un leggero stress ossidativo (6).

Tale azione leggera ha innescato la produzione di enzimi liberi antiossidanti e antiossidativi, che non solo proteggevano le cellule dall'ossidazione e dall'infiammazione, ma anche invertirono lo stress ossidativo cronico. Le nostre scoperte riguardo l'aumento dell'attività (maggior potenza nelle rappresentazioni tempo-frequenza del segnale CYT-c) sembrano confermare che l'ozono stimoli la riduzione dello stress ossidativo cronico e, di conseguenza, potenzi la funzionalità mitocondriale delle cellule neurali. Tale effetto è particolarmente visibile sui pazienti con SM a causa delle loro condizioni iniziali di stress iper-ossidativo e di bassi livelli di CYT-c.

Nei nostri gruppi esemplari, la media di età dei pazienti con SM era pari a  $25.6 \pm 2.7$  anni, considerando che l'età media dei pazienti sani era significativamente più alta ( $65.4 \pm 3.7$  anni). Tuttavia, secondo la nostra opinione, tale differenza non ha distorto la comparazione. Infatti, è stato dimostrato che le menomazioni di CYT-c che causano patologie neurodegenerative da stress ossidativo (30) sono anche presenti, anche se in grado minore, nei mitocondri di tutte le cellule con l'avanzamento dell'età (31). Perciò, abbiamo confrontato un gruppo di pazienti con SM con uno di volontari sani ma che avessero un'attività della CYT-c più bassa come riferimento. Anche nel peggiore delle condizioni, abbiamo osservato che i pazienti con SM che inizialmente avevano livelli più bassi, alla fine aumentavano maggiormente i cambiamenti dell'attività della CYT-c come conseguenza dell'ozono autoemoterapia.

Abbiamo utilizzato un'analisi supervisionata (MANOVA) in modo da capire meglio se le variabili indipendenti e non-collineari fossero realmente descrittive del nostro campione di popolazione. I risultati hanno indicato che le variabili selezionate erano discriminanti tra i due gruppi. Di conseguenza, noi crediamo che la tecnica NIRS potrebbe essere appropriata per monitorare a lungo termine gli effetti sul metabolismo cerebrale e sulla reattività vasomotoria indotti dall'ozonoterapia.

In conclusione, noi proponiamo un approccio congiunto per la registrazione dei dati NIRS e TCD per la valutazione quantitativa dei cambiamenti emodinamici e metabolici che si verificano nella corteccia cerebrale dei pazienti sottoposti all'ozono terapia. Data la complessità e la natura variabile di questi segnali, il tempo, il tempo-frequenza e le tecniche di raggruppamento sono strumenti adatti nei protocolli

sperimentali in psicologia e neuroscienza.

La somministrazione di ozono potrebbe essere molto utile nel trattamento dei disordini neurologici, dal momento che abbiamo dimostrato che si è ottenuto un effetto rilevante sull'attività della citocromo-c-ossidasi, la cui perdita di valore è comune nelle infiammazioni e nelle malattie neurologico-degenerative.

*Gli Autori stanno attualmente valutando l'efficacia clinica dell'ossigeno ozono terapia mediante autoemoinfusione di sangue ozonizzato nel trattamento di pazienti con SM, in uno studio multicentrico che dovrebbe concludersi verso la fine del 2015. Come prospettiva, lo scopo è di osservare se i pazienti di SM sottoposti all'ozono autoemoterapia mostrino un ridotto numero di recidive annuali, un miglioramento nei tracciati funzionali, e la stabilizzazione del numero di lesioni della materia bianca (come documentato dal MRI).*

## RICONOSCIMENTI

Questo lavoro è stato supportato in parte dalla Società Italiana per l'Ossigeno/Ozono Terapia (SIOOT).

## BIBLIOGRAFIA

1. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. "Ozone: a new therapeutic agent in vascular diseases". *AM J Cardiovasc Drugs* 2011;11(2): 73-82.
2. Shah P, Shyam AK, and Shah S. Adjuvant combined ozone therapy for extensive wound over tibia. *Indian J. Orthop* 2011; 45(4):376-9
3. Borrelli E., Diadori A., Zalaffi A. Bocci V. Effects of major ozonated autohemotherapy in the treatment of dry age related macular degeneration: a randomized controlled clinical study. *Int J Ophthalmol* 2012; 5(6): 708-13.
4. Tylicki L, Niewglowski 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(2): 79-82
5. Pecorelli A., Bocci V., Acquaviva A., et. AL., NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 267(1):30-40
6. Sagai M., Bocci V., Mechanism of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res* 2011; 1-29
7. Zamboni P., Galcotti R., Weinstock-Guttman B, Kennedy C., Salvi F., Zivadinov R., Venous angioplasty in patients with multiple sclerosis: results of a pilot stu-

- dy. *Eur J VascEndovacsSurg* 2012; 43(1):116-22
8. Leone MA, Raymkulova O., Naldi P., et al. Chronic cerebrospinal venous insufficiency is not associated with multiple sclerosis and its severity: a blind-verified study. *PLoS One* 2013; 8(2):e56031
  9. Lu F, Sclak M., O'Connor J., Croul S., Lorenzana C., Butunoi C., Kalman B., Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *JNeurolSci* 2000; 177(2):95-103
  10. Arnold S., The power of life-cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signaling and survival. *Mitochondrion* 2012; 12(1): 46-56
  11. Molinari F, Liboni W., Grippi G.,Negri E., Relationship between oxygen supply and cerebral blood flow assessed by transcranial Doppler and near-infrared spectroscopy in healthy subjects during breath-holding. *J NeuroengRehabil* 2006; 3:16
  12. Liboni W., Molinari F., Allais G., et. Al., Why do we need NIRS in migraine? *NeurolSci* 2007; 28(S)2:S222-4
  13. Lee JK., Kibler KK., Benni PB., et. Al., Cerebrovascular reactivity measured by near-infrared spectroscopy. *Stroke* 2009; 40(5):1820-6
  14. Aaslid R., Cerebral autoregulation and vasomotor reactivity. *FrontNeurolNeurosci* 2006; 21: 216-28
  15. Tsivgoulis G., Alexandrov AV., Sloan MA., Advances in transcranial Doppler ultrasonography. *CurrNeurolNeurosci Rep* 2009; 9(1):46-54
  16. Totaro R.,Barattelli G., Quaresima V., Carolei A., Ferrari M. Evaluation of potential factors affecting the measurement of cerebrovascular reactivity by near-infrared spectroscopy. *ClinSci (Lond)* 1998; 95(4):497-504
  17. Molinari F, Rosati S., Liboni W., Negri E., ManaO.,Allais G., Benedetto C. Time-frequency characterization of cerebral hemodynamics of migraine sufferers as assessed by NIRS signals. *Eurasip. J Advances Signal Process* 2010
  18. Loughlin PJ., Pitton JW., Atlas LE., Bilinear time-frequency representations – new insights and properties. *Ieee Transactions on signal Processing* 1993; 41(2): 750-67
  19. Dunn LT. Raised intracranial pressure. *J NeurolNeurosurg Psychiatry* 2002; 73(S): 123-7
  20. Obrig H., Neufang M., Wenzel R., Kohl M., Steinbrink I., Einhaupl K., Villringer A. Spontaneous low frequency oscillations of cerebral hemodynamics and metabolism in human adults. *Neuroimage* 2000; 12(6): 623-39
  21. Rosati S., Balestra G., Molinari F. Feature selection applied to the time-frequency representation of muscle near-infrared spectroscopy (Nirs) signals: Characterization of diabetic oxygenation patterns. *J Mechanics Med Biol* 2012; 12(4)
  22. Rosati S., Balestra G., Molinari F. Feature extraction by quickreduct algorithm: assessment of migraineurs neurovascular pattern. *J Med Imaging Health Informatics* 2011; 1(2): 184-92
  23. Giustetto P., Liboni W., Mana O., Allais G., Benedetto C., Molinari F. Joint Metabonomic and instrumental analysis for the classification of migraine patients with 677-MTHFR mutations. *Open Med Inform J* 2010; 4:23-30
  24. Canova D., Roatta S., Micieli G., Bosone D. cerebral oxygenation and haemodynamic effects induced by nimodipine in healthy subjects. *FunctNeurol* 2012; 27(3):169-76
  25. Viola S., Viola P., Buongarzone MP., Fiorelli L., Litterio P. Tissue oxygen saturation and pulsatility index as markers for amnesic mild cognitive impairment: NIRS and TCD study. *ClinNeurophysiol* 2013; 124(5): 851-6
  26. Obrig H. NIRS in clinical neurology – a ‘promising’ tool? *Neuroimage* 2014; 851: 535-46
  27. Clavo B., Catala L., Perez JL., Rodriguez V., Robaina F. Ozone Therapy on cerebral blood flow: a preliminary report. *Evid Based Complement Altemal Med* 2004; 1(3): 315-19
  28. Shehata NI., Abd-Elgawad HM., Mawsouf MN.,-Shaheen AA. The potential role of ozone in ameliorating the age-related biochemical changes in male rat cerebral cortex. *Biogerontology* 2012; 13(6):565-81
  29. Broadwater L., Pandit A., Clements R., et al., Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex. *BiochimBiophysActa* 2011; 1812(5): 630-41
  30. Arnold S. Cytochrome c oxidase and its role in neurodegeneration and neuroprotection. *AdvExp Med Biol* 2012; 748: 305-39
  31. Das KC., Muniyappa H. Age-dependent mitochondrial energy dynamics in the mice heart: role of superoxide dismutase-2. *ExpGerontol* 2013; 48(9):947-59