

# Terapija ozonom u medicini i dentalnoj medicini

---

**Nikolić, Marina; Šoić-Vranić, Tamara; Peranović, Aleksandra;  
Giacometti, Jasminka**

*Source / Izvornik:* **Medicina Fluminensis : Medicina Fluminensis, 2024, 60, 273 - 296**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

[https://doi.org/10.21860/medflum2024\\_319214](https://doi.org/10.21860/medflum2024_319214)

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:499981>

*Rights / Prava:* [Attribution 4.0 International](#)/[Imenovanje 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of  
Medicine - FMRI Repository](#)



# Terapija ozonom u medicini i dentalnoj medicini

## Ozone Therapy in Medicine and Dentistry

Marina Nikolić<sup>1\*</sup>, Tamara Šoić-Vranić<sup>1</sup>, Aleksandra Peranović<sup>2</sup>, Jasminka Giacometti<sup>2</sup>

**Sažetak.** Cilj je ovog preglednog rada prikazati sažetak trenutnog stanja primjene terapije ozonom u medicini i dentalnoj medicini na temelju pretraživanja znanstvenih članaka i kliničkih studija. Pretraživanjem tražilice PubMed uočen je značajan porast broja kliničkih istraživanja u periodu od 2015. do danas, a posebno u posljednje tri godine, što ukazuje na sve veći interes za kliničku primjenu. Tome pridonosi razvoj sigurnih uređaja i načina uporabe. Ozon je otkriven prije više od stotinu godina i od tada se široko koristi u mnogim područjima uključujući mnoge grane medicine. Mnogobrojne studije dokazale su pozitivan učinak ozona na antioksidativni kapacitet, kao i na modulacije u vaskularnom, hematološkom i imunološkom sustavu, ali i njegovu efikasnost ako se primjenjuje kao adjuvans u konvencionalnim terapijama. Snažan oksidacijski učinak ozona omogućava suzbijanje gotovo svih mikroorganizama, zbog čega ozon ima baktericidna, virucidna i fungicidna svojstva. Međutim, unatoč korisnim učincima koji mu omogućuju široku primjenu u medicini, primjena u dentalnoj medicini nije pokazala očekivanu učinkovitost. Lokalna primjena ozona, kao antimikrobnog sredstva za nekirurško liječenje parodontne bolesti, dobar je alat potpore parodontnoj terapiji.

**Ključne riječi:** dentalna medicina; medicina; ozon

**Abstract.** The aim of this review is to provide an overview of the status of the use of ozone therapy in medicine and dentistry, based on a search for scientific articles and clinical studies. A search in the PubMed search engine revealed a positive trend, namely a significant increase in clinical research in the period from 2015. to date, especially in the last three years, indicating an increasing interest in clinical application. The development of safe devices and application methods contributes to this. Ozone was discovered over a hundred years ago and has since been used in many areas, including medicine. Numerous studies have demonstrated the positive effect of ozone on antioxidant capacity and on modulations in the vascular, haematological and immunological systems, as well as its effectiveness as an adjunct to conventional therapies. The strong oxidising effect of ozone enables the suppression of almost all microorganisms, which is why ozone exhibits bactericidal, virucidal and fungicidal properties. However, despite the positive effects that enable its broad application in medicine, the use of ozone in dentistry has not shown the expected effectiveness. The local application of ozone as an antimicrobial agent for the non-surgical treatment of periodontal diseases is a good tool to support periodontal therapy.

**Keywords:** dentistry; medicine; ozone

<sup>1</sup> Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka, Hrvatska

<sup>2</sup> Sveučilište u Rijeci, Fakultet biotehnologije i razvoja lijekova, Rijeka, Hrvatska

**\*Dopisni autor:**

Izv. prof. dr. sc. Marina Nikolić, dr. med.  
Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet  
Braće Branchetta 20, 51000 Rijeka, Hrvatska  
E-mail: nmarina@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

Terapija ozonom ( $O_3$ ) intenzivno se proučava i koristi više od jednog stoljeća. Terapeutski potencijal  $O_3$  u medicini (ili  $O_2$ - $O_3$  terapija, gdje se  $O_2$  koristiti za dobivanje  $O_3$  u generatoru ozona) predložen je davne 1896. godine kada je Nikola Tesla izgradio prvi ozonski generator koji se koristio kao dezinfekcijsko sredstvo, ali i za medicinsku terapiju. Iako ozon ima i negativne učinke na ljudsko zdravlje, brojni primjeri potvrđuju njegovu primjenu u mnogim područjima medicine i u dentalnoj medicini<sup>1,2</sup>.

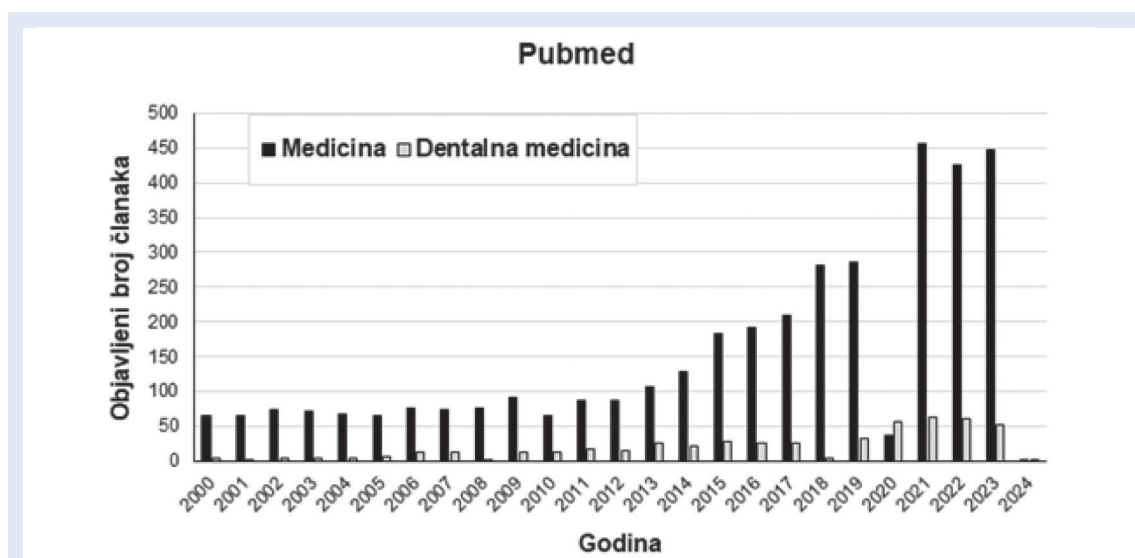
Terapija ozonom pokazala se obećavajućom alternativnom ili komplementarnom opcijom liječenja za različita medicinska stanja i primjene u dentalnoj medicini.

U periodu od 2000. do 2024. godine u bazi PubMed objavljeno je 3568 cjelovitih članaka iz područja medicine i 456 radova u području dentalne medicine, a odnosili su se na članke s cjelovitim tekstom uključujući klinička ispitivanja, randomizirana kontrolirana ispitivanja, pregledne članke, sustavne pregledne članke i metaanalize u medicini i dentalnoj medicini (Slika 1). Zadnjih je godina u oba područja zabilježen značajan trend porasta objavljenih znanstvenih članaka, naročito u periodu od 2021. godine do danas, što ukazuje

na rast interesa za ovu metodu liječenja. Stoga je cilj ovog rada dati pregled znanstvenih članaka koji prikazuju primjenu ozona u medicini i dentalnoj medicini te ukazati na njegove karakteristike, najčešće uređaje koji ga stvaraju, mehanizme toksičnosti, odnosno prednosti i nedostatke terapeutske primjene ozona.

Ozon je jak oksidans i zbog svog snažnog oksidacijskog djelovanja može biti toksičan. Međutim, pravilnom i kontroliranom primjenom može se uspješno koristiti u dezinfekciji i liječenju bolesti kroz inaktivaciju patogena, stimulaciju metabolizma kisika, aktivaciju imunskog sustava i dr. Nakon ulaska ozona u organizam, dolazi do njegove interakcije s biomolekulama te direktnog i indirektnog djelovanja povećanjem proizvodnje citokina i stimulacije stvaranja leukocita povećanjem kemijskih glasnika i stimulacije sinteze glutaciona.

S obzirom na neuobičajen oblik za primjenu u terapiji, bilo je potrebno razviti posebne tehnike koje su omogućile sigurnu uporabu i proizvodnju ozona. Zbog kratkog vremena poluraspada ozon se proizvodi u generatorima u prostoru primjene. Generatori ozona stvaraju čisti ozon oponašajući prirodne pojave nastanka ozona iz zraka, čistog kisika ili vode. Tako nastali medicinski ozon dugo se godina koristio samo za dezinfekciju, no napretkom tehnologije i istraživanja primjene ozona u medicini znatno je proširena njegova primjena.



**Slika 1.** Objavljeni broj znanstvenih članaka povezan s primjenom u području medicine i u području dentalne medicine u bazi PubMed u periodu od 2000. do 2024.

Stoga, ovaj pregledni rad ima za cilj pružiti čitateljima bitne temeljne i primjenjive informacije o terapiji ozonom u medicini i dentalnoj medicini.

### DEFINICIJA, KARAKTERISTIKE I TOKSIČNOST OZONA (O<sub>3</sub>)

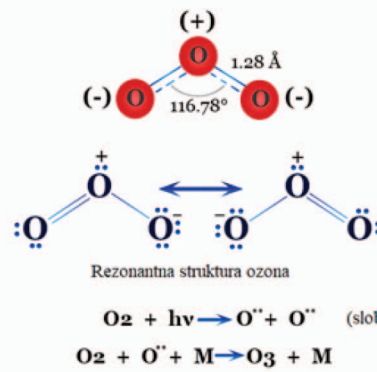
Ozon (O<sub>3</sub>) alotropska je modifikacija kisika (O<sub>2</sub>) koju u prirodi najčešće nalazimo u plinovitom stanju (Slika 2). To je plin modre boje, oštroga i nadražujućeg mirisa već pri iznimno niskim koncentracijama<sup>3</sup>.

Nakon fluora, ozon je najjače oksidacijsko sredstvo visoke djelotvornosti, ali i toksičnosti. Ozon može nastati prirodnim (u atmosferi) i sintetskim putem (u uređajima koji proizvode ozon).

Prirodnim putem ozon nastaje kemijskim procesom u dva stupnja u atmosferi<sup>3</sup>. Proces nastanka ozona bitno se razlikuje ovisno o tome u kojem dijelu atmosfere se odvija takav proces jer su polazne tvari različite. U stratosferi se ozon stvara iz molekula kisika (O<sub>2</sub>) pod utjecajem sunčevog ultraljubičastog (engl. *ultraviolet*; UV) zračenja pri čemu čini stratosferski ozonski omotač (Slika 3). Stratosferski ozon naziva se „dobar“ ozon jer štiti površinu Zemlje od utjecaja loših Sunčevih zraka stvarajući ozonski omotač oko Zemlje. Nešto stratosferskog ozona redovito se prenosi prema nižim slojevima atmosfere u troposferu i može utjecati na količine ozona na Zemljinoj površini (osobito u nezagađenim područjima Zemlje). Proizvodnja stratosferskog ozona uravnotežena je njegovim raspadom.

U nižim slojevima atmosfere, u blizini površine Zemlje, ozon nastaje kemijskim reakcijama plinova koji se pojavljuju u prirodi i plinova koji su izvori onečišćenja. Na primjer, prekomjerne emisije dušikovih spojeva NO<sub>x</sub> (NO, NO<sub>2</sub>) i hlapljivi organski spojevi (engl. *volatile organic compounds*; VOCs) pomoću Sunčevog UV zračenja utječu na raspad molekula NO<sub>x</sub>, reagiraju s molekulama kisika te nastaje ozon koji zaostaje u troposferi. Troposferski ozon zadržava se oko 22 dana, nakon čega se raspada na hidroksilne spojeve ili peroksilne radikale.

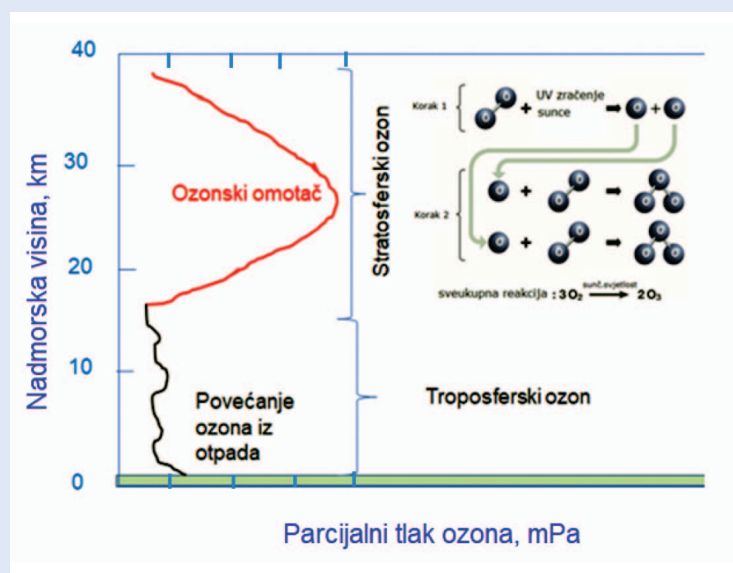
Zagađenja pogoduju porastu koncentracije ozona u troposferi. Troposferski ozon je „loš“ ozon jer njegovo snažno oksidacijsko djelovanje ima nepovoljan učinak na Zemljinu biosferu. Reakcija



Slika 2. Struktura i nastajanje ozona – M označava tijelo (preuzeto s web-stranice: <https://www.priyamstudycentre.com/2021/02/ozone-gas.html>)

spomenutih kemijskih spojeva omogućava stvaranje tzv. fotokatalitičkog smoga, koji sadržava glavne toksične tvari koje negativno utječu na respiratorne organe i kožu.

Sintetskim putem, ozon se proizvodi oponašanjem njegovog nastanka u prirodi (UV zračenje i električno pražnjenje)<sup>4, 5</sup>.



Slika 3. Ozon u atmosferi

Ozon je prisutan u cijeloj troposferi i stratosferi. Shematski prikaz profila pokazuje kako se parcijalni tlak (koncentracija) ozona mijenja s nadmorskom visinom. Većina ozona nalazi se u stratosferskom „ozonskom omotaču“. Debljina okomitog sloja varira ovisno o geografskim regijama i godišnjem dobu. Povećanje ozona blizu površine Zemlje rezultat je onečišćenja uzrokovano ljudskim aktivnostima (modificirano prema Fahey i Hegglin<sup>3</sup>).

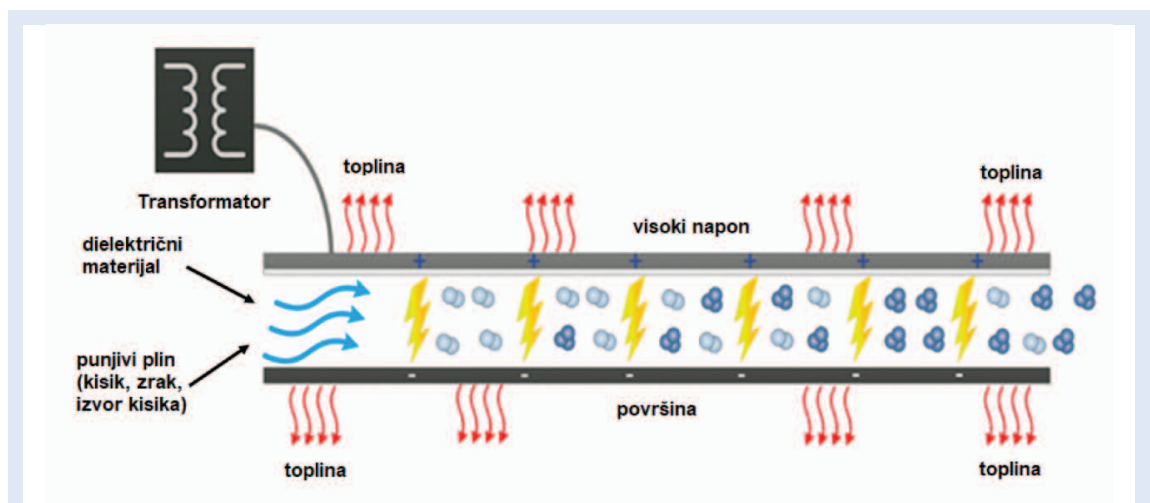
### UREĐAJI ZA PROIZVODNJU OZONA (GENERATORI OZONA)

Generatori ozona u kontroliranim uvjetima oponašaju prirodne pojave pri kojima nastaje ozon. Uređaji se obično razvrstavaju po načinu nastajanja ozona – na generatore ozona koji se temelje na električnom pražnjenju uz nastanak korone, UV generatore ozona koji se temelje na djelovanju UV zračenja i elektrolitske generatore ozona koji proizvode ozon izravno u vodi. Prednost elektrolitskih generatora je što nije potrebna oprema za kontakt koja je inače potrebna za otapanje ozona u vodi<sup>6</sup>.

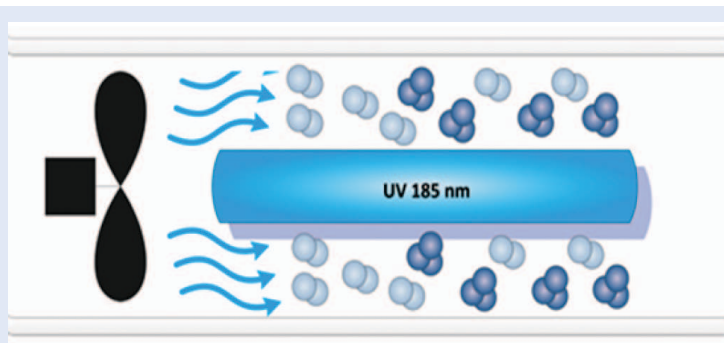
Generatori ozona koji se temelje na električnom pražnjenju uz nastanak korone (Slika 4), potiskuju kisik iz zraka kroz metalne rešetke visokog napona (dielektrični materijal), gdje se molekule kisika cijepaju na visoko reaktivne kisikove atome koji

se potom spajaju s molekulama kisika iz zraka, pri čemu nastaje ozon. Ovakav način stvaranja ozona često se rabi zbog visoke koncentracije ozona koju stvara, ali i samog postojanog stvaranja. Sinonimi za ovu vrstu generatora ozona jesu „hladne plazme“, „generatori plazme“, „hladne korone“ i dr.<sup>7</sup>

Ozon se proizvodi iz UV svjetla valnih duljina između 100 i 240 nm. U tu svrhu može se koristiti kratkovalna niskotlačna UV lampa. Ove će lampe proizvoditi UV zračenje s dva maksimuma u UV spektru, jedan na 254 nm, a drugi na 185 nm (Slika 5). Svjetlo od 185 nm je ono što se naziva lampom koja „proizvodi ozon“, dok se svjetlo od 254 nm naziva „germicidnom“ lampom. Ova vrsta generatora manje je učinkovita od prethodne zbog manje koncentracije čistoga ozona koji se dobiva ovim putem. Prednost generatora s UV zračenjem jest niža cijena procesa stvaranja ozona, kao i jednostavnije postavljanje i korištenje<sup>6</sup>.



Slika 4. Generator koji se temelji na električnom pražnjenju uz nastanak korone (preuzeto s web-stranice: <https://www.oxidationtech.com/ozone/ozone-production/corona-discharge.html>)



Slika 5. Proizvodnja ozona pomoću UV svjetla (preuzeto s web-stranice: <https://www.oxidationtech.com/ozone/ozone-production/uv-lamp.html>)

Kako vlažnost zraka i temperatura izrazito utječu na dobivanje ozona, nepovoljni uvjeti mogu smanjiti efikasnost generatora i do 50 %, čime se gubi na kvaliteti i kvantiteti završnog proizvoda. Stoga se u zadnje vrijeme koriste i elektrolitički generatori ozona, koji kao izvor za dobivanje ozona koriste ultračistu vodu. Električnim pražnjenjem voda se cijepa na molekularni kisik i vodik, odnosno daljnjom reakcijom iz kisika nastaje ozon. Ova vrsta generatora svrstava se u elektrolitičke jer se princip rada zasniva na elektrolizi. Elektrolitički generatori visoke su učinkovitosti, a budući da je

polazna tvar voda, temperatura i vlažnost zraka nemaju utjecaja na ishod reakcije<sup>8,9</sup>.

### TOKSIČNOST OZONA

Ozon oksidira ili peroksidira biomolekule bilo direktnim ili indirektnim putem, putem reakcija koje pokreću slobodni radikali. Niz takvih reakcija može različitim mehanizmima toksičnosti dovesti do oštećenja lipida, gubljenja funkcionalnih skupina enzima i strukturnih promjena u membrani stanice, ali i do oštećenja stanice i stanične smrti. Razlog toksičnosti ozona leži u njegovoj sposobnosti da stvara slobodne radikale u biološkim sustavima, koji negativno utječu na pluća, krv, slezenu, centralni živčani sustav i druge organe<sup>10</sup>. Mehanizmi toksičnosti ozona mogu se svrstati u nekoliko kategorija: a) stvaranje slobodnih radikala; b) peroksidacija lipida (lipoperoksidacija) i promjene u propusnosti membrane; c) gubitak funkcionalnih skupina i enzimске aktivnosti; d) sekundarni procesi.

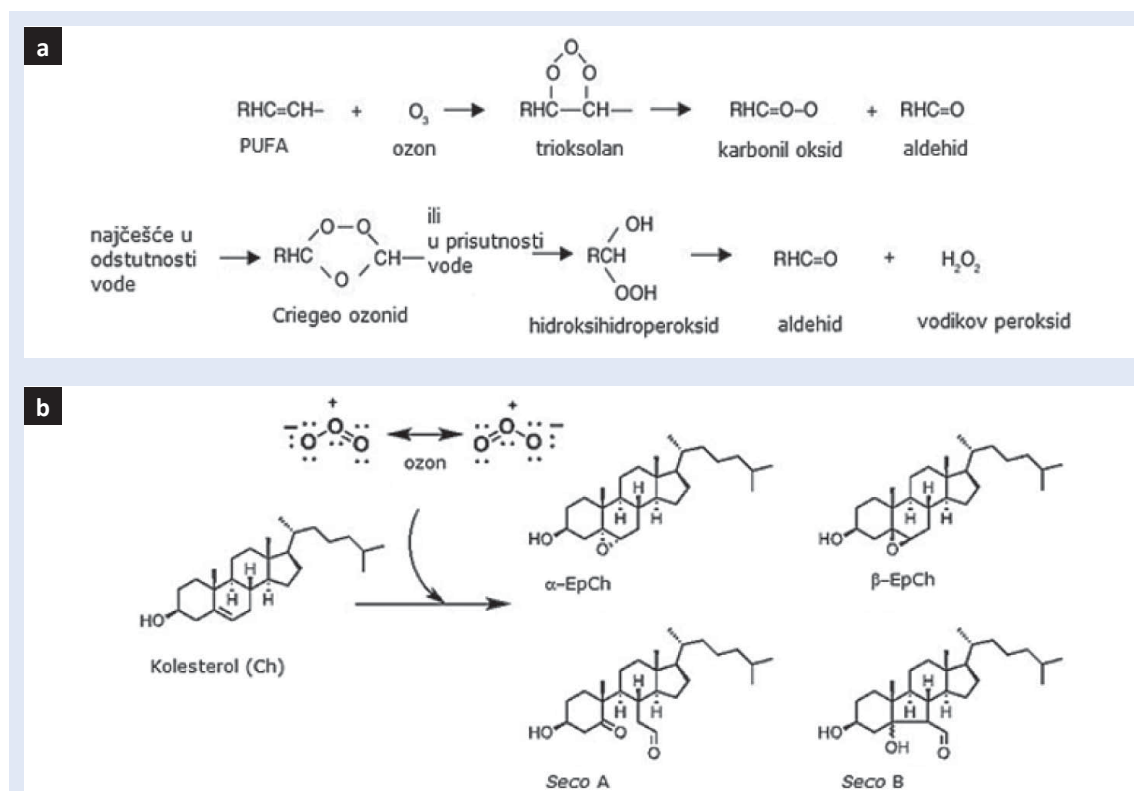
Osim ovih učinaka, dokazano je da su veće dnevne koncentracije ozona povezane s povećanim

brojem hospitalizacija, povećanjem dnevne smrtnosti te drugim pokazateljima morbiditeta.

Primarna izloženost događa se kada ljudi udišu zrak iz okoline koji sadrži ozon. Stopa izloženosti za određenu osobu povezana je s koncentracijom ozona u okolnom zraku i količinom zraka koju osoba udiše u minuti (minutna ventilacija). Kumulativni iznos izloženosti funkcija je i stope i trajanja izloženosti. U odnosu na vanjski prostor, razine ozona u zatvorenom prostoru mogu utjecati na razine nekih aldehida nastalih kao produkt reakcije ozona s umjetnim tvarima od kojih je izrađen namještaj<sup>11</sup>. To predstavlja potencijalni put učinka ozona na respiratorni sustav u ljudi u zatvorenim prostorima posredovan proizvodima reakcije ozona sa sintetičkim materijalima<sup>12,13</sup>. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja koja bi potvrdila toksični učinak ozona u zatvorenim prostorima.

### Stvaranje slobodnih radikala

Ozon može reagirati s alkanima, alkenima, aminima, sulfhidridima i drugim organskim molekulama stvarajući radikalne intermedijere i radikale.



**Slika 6.** Reakcije ozona: a) s višestruko nezasićenim masnim kiselinama (engl. *polyunsaturated fatty acids*; PUFA)<sup>15</sup>; b) s kolesterolom, pri čemu nastaju oksisteroli<sup>10</sup> (licencija preuzetih slika Creative Commons CC BY 4.0.)

Primjerice, reakcijom ozona s C-H vezom alkana nastaje nusproizvod hidrotrioksid (ROOOH) koji se kasnije raspada na radikalne intermedijere. Smatra se kako je upravo ovo stvaranje slobodnih radikala odgovorno za oštećenje koje nastaje na membranama i lipidima u kontaktu s ozonom.

U vodenim otopinama ozon se raspada na vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), superoksid ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $HO^{\cdot}$ ) i hidroperoksil ( $HO_2^{\cdot}$ ), radikale koji negativno utječu na stanicu i njezine dijelove<sup>10,14</sup> (Slika 6).

### Peroksidacija lipida i promjene propusnosti membrane

Peroksidacija membranskih lipida (nezasićene masne kiseline i kolesterol) smatra se najvažnijim mehanizmom pomoću kojeg ozon oštećuje stanicu. U inicijalnoj reakciji s nezasićenim masnim kiselinama dolazi do adicije ozona na dvostruku vezu (C=C), pri čemu nastaje intermedijer triksolan. On dalje stvara ozonid (poliatomski anion) koji raspadom stvara lipidne perokside ili hidroperokside (Slika 7). U reakcijama s kolesterolom i jednostruko nezasićenim masnim kiselinama nastaje epoksid, dok s višestruko nezasićenim masnim kiselinama nastaje dialdehid<sup>10,14</sup>.

Lipidi i proteini glavni su sastojci stanične membrane koji omogućavaju njezinu fluidnost i propusnost. Stanične i unutarstanične membrane koje u sebi sadrže višestruko nezasićene masne kiseline (engl. *polyunsaturated fatty acids*; PUFAs) kao što su omega-3 i omega-6, najčešće su mete oštećenja zbog izlaganja ozonu. Oksidacijske promjene u strukturi membrana dovode do promjene u njihovoj propusnosti, što omogućuje protok onih tvari za koje bi neoštećena membrana bila prepreka<sup>10,15</sup>.

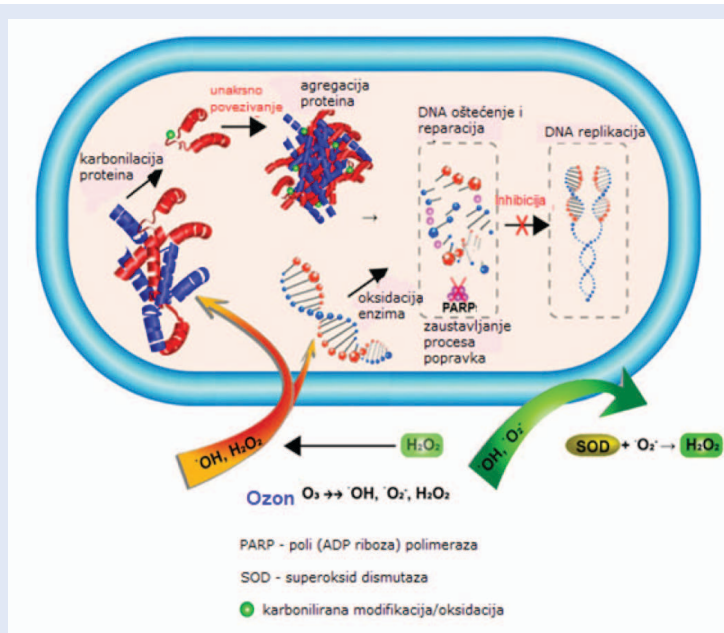
### Gubitak funkcionalnih skupina i enzimске aktivnosti

Ozon direktno i indirektno slobodnim radikalima oksidira funkcionalne skupine enzima kao što su amino, karbonilna, hidroksilna i sulfhidrilna skupina. Oksidacija utječe na redoks-status stanice, pridonosi staničnoj disfunkciji i promjeni metaboličkih funkcija. Važnost oksidacije proteina za staničnu homeostazu proizlazi iz činjenice da proteini imaju vitalne uloge u regulaciji stanične strukture, staničnoj signalizaciji i raznim enzimskim procesima u stanici.

Oksidacija se u proteinima najčešće odvija na ostatcima cisteina, metionina, tirozina, triptofana i histidina<sup>10</sup>. Bočni lanci aromatskih aminokiselina oksidacijom stvaraju različite međuprodukte. Na primjer, oksidacija bočnih ostataka fenilalanina dovodi do stvaranja monohidroksilnih i dihidroksilnih derivata, dok se ostatci triptofana pretvaraju u nekoliko hidroksilnih derivata (u formilkinurenin i nitrotriptofan). Ostatci metionina i cisteina oksidiraju na mjestu sulfhidrilnih ostataka i rezultiraju stvaranjem sulfoksida, sulfenskih kiselina i disulfidnih mostova. Bitno je naglasiti da oksidativne modifikacije aminokiselina koje sadrže sumpor, mogu biti reverzibilne. U citosolu i mitohondrijima eukariotskih stanica postoje sustavi tioredoksina i glutaredoksina koji su odgovorni za redukciju ostataka cisteina.

Nastale promjene utječu na sposobnost savijanja i terciarnu strukturu proteina. Osim toga, oksidacija proteina može uzrokovati promjene u strukturi aminokiselina, povećanje hidrofobnosti proteina i gubitak enzimске aktivnosti.

Međutim, glavni proizvod oksidacije proteina, uslijed cijepanja peptidne veze i oksidacije aminokiselina, jest proizvodnja proteinskog karbonila.



**Slika 7.** Raspad ozona u vodenj otopini i utjecaj nastalih radikala na bakterijsku staničnu membranu, unutarstanične proteine i DNA<sup>14</sup> (licencija preuzete slike Creative Commons CC BY 4.0.)

## Sekundarni procesi

U sekundarne procese ubrajaju se svi drugi nespecifični procesi izazvani ozonom.

Smatra se da izlučeni histamin u plućima pridonosi razvoju akutne toksičnosti koja se povezuje s djelovanjem ozona<sup>10, 16</sup>. Učinak izloženosti ozonu na mišjem modelu pokazao je da pogoršanje alergijske upale izazvano ozonom ovisi o slijedu izlaganja i koncentraciji ozona<sup>17</sup>. Ipak, Hansen i sur.<sup>18</sup> nisu uočili pogoršanje u miševa alergičnih na ovalbumin, već je uočeno suprotno, da su alergični miševi zaštićeni od učinka iritacije ozonom u dišnim putevima<sup>18</sup>. Autori su zaključili da vrijeme izlaganja i koncentracija ozona mogu dovesti do različitih reakcija u dišnim putevima.

Ovisno o dozi i učestalosti, ozon može izazvati različite ozljede i upale u plućima<sup>19, 20</sup>. Inhalacija ozona uzrokuje upalu pluća koja dovodi do nakupljanja sadržaja plazme i imunskih stanica u epitelu bronha i alveola, čime dolazi do propusnosti membrana i oštećenja tkiva uslijed obrambenog mehanizma protiv negativnog učinka ozona<sup>21, 22</sup>. Poznato je da izloženost čak i maloj količini ozona može uzrokovati pogoršanje astme i daljnje pogoršanje simptoma bolesti dišnog sustava, čak i s povećanjem smrtnosti<sup>23</sup> (Tablica 1). Dosljednost i koherentnost dokaza o učincima na astmatičare ukazuju na to da ozon može pogoršati simptome astme i povećati osjetljivost na okidače astme<sup>24</sup>. Ovisno o koncentraciji ozona pojavljuju se simptomi prikazani u Tablici 1.

Budući da ozon ima ograničenu topljivost u vodi, gornji dišni putevi nisu toliko učinkoviti u čišćenju ozona iz udahnutog zraka kao što je to slučaj sa zagađivačima topljivijim u vodi, poput sumporovog dioksida (SO<sub>2</sub>) ili klora (Cl<sub>2</sub>). Posljedično, većina inhaliranog ozona dospijeva u donje dišne

puteve i otapa se u tankom sloju epitelne tekućine (engl. *epithelial lining fluid*; ELF) kroz dišne puteve pluća. U plućima ozon brzo reagira s nizom biomolekula, osobito onima koje sadrže tiolne i amino skupine ili C=C veze. Ove reakcije i njihovi proizvodi nedovoljno su opisani, ali se smatra da su krajnji učinci izloženosti ozonu posredovani slobodnim radikalima i drugim vrstama oksidansa na ELF, koji zatim reagiraju s temeljnim epitelnim i imunskim stanicama te s receptorima neurona dišnih putova. U nekim slučajevima ozon može izravno reagirati s tim strukturama. Učinci različitih mehanizama javljaju se istodobno nakon kratkotrajne izloženosti ozonu<sup>25</sup>.

Akutna izloženost ozonu (jednokratna izloženost niskim ili visokim koncentracijama) dovodi do akutnog poremećaja epitela dišnih puteva s ljuštenjem epitelnih stanica i istjecanjem tekućine uslijed oštećenja membrana<sup>19, 20</sup>. Nedavno je istraživanje pokazalo da ozon mijenja ekspresiju kladina-3 i kladina-4 u bronhijalnom epitelu miša, što dovodi do propusnosti membrane, vjerojatno putem reaktivnih vrsta kisika (engl. *reactive oxygen species*; ROS) koji luče alveolarni makrofagi<sup>26, 27</sup>. Poremećaj epitela izazvan ozonom povezan je s oslobađanjem interleukina (IL) -1 $\alpha$  i IL-33 epitelnih stanica zajedno s kemokinima CXCL1 i CCL2, upalnim proteinom 2 makrofaga (MIP-2) i IL-6 u makrofazima i regrutiranjem neutrofila u dišne puteve, izazivajući neutrofilnu upalu<sup>19, 28, 29</sup>.

Nakon akutne izloženosti ozonu, ključnu ulogu u patogenezi upale dišnih puteva ima oksidacijski stres, putem mitohondrijskih reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *mitochondrial reactive oxygen species*; mtROS), i aktivacija omjera neutrofila i limfocita (engl. *neutrophil to lymphocyte ratio*; NLR),

**Tablica 1.** Toksični učinak ozona ovisno o vrijednostima izloženosti ozonu iz zraka<sup>2</sup>

| Koncentracija ozona u zraku (mg/L) | Simptomi  |
|------------------------------------|---|
| 0,1                                | Raspiratorni trakt i nadražaj očiju               |
| 1,0-2,0                            | Rinitis, kašalj, glavobolja, mučnina i povraćanje |
| 2,0-5,0 (10-20 mm)                 | Dispneja i bronhijalni spazmi                     |
| 5,0 (60 min)                       | Akutni plućni edem i povremena paraliza disanja   |
| 10,0                               | Smrt za četiri sata                               |
| 50,0                               | Smrt za nekoliko minuta                           |

\*Toksičnost ozona na respiratorni sustav ne bi se trebala odraziti na krvožilni sustav zbog biokemijskih i metaboličkih razlika<sup>6</sup>.



odnosno inflamatom koji sadrži protein 3 pirinske domene (NLRP3)<sup>30,31</sup>. Kao rezultat aktivacije upale ozonom, NLRP3 inducira interleukin 17A (IL-17A) koji luče stanice urođene imunosti, poput urođenih limfoidnih stanica ili gama-delta stanica T (engl. *gamma delta T cells*;  $\gamma\delta$  T), što također pridonosi aktivaciji i privlačenju neutrofila u dišne puteve te dovodi do hiperreaktivnosti dišnih puteva<sup>32</sup>.

Standardizacija protokola kliničke primjene terapije ozonom neophodna je za uspostavu ujednačenih postupaka liječenja, doziranja i načina primjene u cilju povećanja sigurnosti i učinkovitosti terapije te njihove usporedbe.

Kronična izloženost ozonu (višestruka izloženost niskim ili visokim koncentracijama) izaziva slične simptome kao akutna izloženost, ali s pojačanim djelovanjem. Istraživanja na miševima pokazala su da opetovano izlaganje ozonu dovodi do upale pluća, oksidacijskog stresa, disfunkcije mitohondrija, aktivacije upale NLRP3 i na kraju, emfizema s fibrozom u plućima<sup>19,21</sup>. Osim toga, nedavno je dokazano da kronična izloženost ozonu dovodi do aktivacije receptora arilnih ugljikovodika (engl. *aryl hydrocarbon receptor*; AhR), koji su široko izraženi na imunološkim i epitelnim stanicama i imaju zaštitnu ulogu putem proizvodnje IL-22 u plućima. Ozon izaziva proizvodnju triptofana i lipoksina A4 (engl. *lipoxin A4*; LXA4), koji su ligandi za AhR, a nakon njegove aktivacije potisnute su razine IL-22 zajedno s urođenim limfoidnim stanicama tipa 3 (engl. *type 3 innate lymphoid cells*; ILC3) i stanicama  $\gamma\delta$  T, što dovodi do manje upale i izaziva remodeliranje tkiva<sup>22</sup>.

Kontrolirana izloženost ozona u ljudi uzrokuje povećanje upale uslijed dotoka neutrofila u pluća i povećanja razine proupalnih citokina<sup>33</sup>, značajnog povećanja proteina Clara stanica u plazmi (CC16) kao biljega oštećenja epitelnih stanica ovisno o koncentraciji ozona. Nakon izlaganja ozonu, neutrofilni iskašljaja (sputuma) pokazali su mali značajan porast, dok proupalni citokini IL-6, IL-8 i faktor nekroze tumora  $\alpha$  (engl. *tumor necrosis factor alpha*; TNF- $\alpha$ ) nisu bili značajno promijenjeni<sup>34</sup>.

Istraživanjem učinka pretilosti na odgovor izloženosti ozonu pokazao je da su pretile žene imale veće smanjenje prisilnog vitalnog kapaciteta (engl. *forced vital capacity*; FVC) povezano s akutnom izloženosti ozonu u odnosu na žene normalne težine<sup>35,36</sup>. Međutim, u istom istraživanju nisu uočene razlike povezane s pretilošću u reaktivnosti i upali dišnih puteva.

Pretilost i spolne razlike opisane su kao čimbenici rizika povećanja odgovora na ozon<sup>37</sup>. Kod pretilih miševa pokazalo se da akutna izloženost ozonu dovodi do daljnjeg povećanja IL-17A u plućima što dovodi do većeg uključivanja neutrofila i proosjetljivosti dišnih puteva<sup>38</sup>. Osim toga, potvrđeno je da izlaganje ozonu mužjaka i ženki miševa pokazuje različite odgovore na staničnu upalu i hiperreaktivnost dišnih puteva. Ovu razliku autori tumače razlikama u mikrobiomu mužjaka i ženki<sup>39,40</sup>.

IL-33 pridonosi odgovoru pluća na akutnu izloženost ozonu u pretilih db/db miševa<sup>41</sup>. Ekspresija se u epitelnim stanicama dišnih puteva i oslobađa se nakon stanične nekroze te nakon ozljede izazvane ozonom. IL-33 i njegov receptor, interleukin 1 sličan receptor 1 (engl. *interleukin 1 receptor-like 1*; ST2 ili IL1RL1), genetski su povezani s astmom. Prehrana utječe na promjene u crijevnom mikrobiomu te utječe na odgovor IL-33 na izloženost ozonu u pretilih miševa<sup>41</sup>.

#### PRIMJENA OZONA U MEDICINI

Terapija ozonom je medicinska opcija koja se u medicini primjenjuje godinama<sup>42</sup>. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*; WHO) potiče i jača uvođenje, prepoznavanje i korištenje integrativne medicine. Stoga je cilj Svjetske federacije terapije ozonom (engl. *World Federation of Ozone Therapy*; WFOT) sistematizirati dostupne znanstvene dokaze koji bi pridonosili integrativnom tretmanu ozonom u različitim kliničkim stanjima i promovirati praksu utemeljenu na dokazima. Ovaj je tretman trenutno dostupan i priznat kao medicinski postupak u zemljama kao što su Njemačka, Italija, Rusija, Portugal, Španjolska, Turska, Grčka, Egipat, Kina, Kuba, Meksiko, Brazil, Honduras i nekoliko istočnoeuropskih zemalja. U Italiji se ova terapija nije službeno primjenjivala sve do 1983. godine, kada je osnovano

Talijansko znanstveno društvo za terapiju kisikom i ozonom (SIOOT). Budući da europska komisija (EU) nema legislativu niti bazu podataka koja sadrži primjenu terapije ozonom, na državama članicama leži odgovornost u okviru upravljanja zdravstvenim uslugama i medicinskom skrbi te raspodjele sredstava (prema čl.168 UFEU).

Unatoč brojnim prednostima primjene ozona u medicini, mnogo je prijevora koji smanjuju njegovu primjenu. Uzrok nedovoljne primjene vezan je uz toksičnost ozona, pretjeran empirijski pristup i problem šarlatanstva, nedostatak standardnih metoda, regulativu i nezainteresiranost u sustavu zdravstva, nedostatak financijske podrške, nedostatak preciznih generatora ozona, nedostatak temeljnih i kliničkih istraživanja te uz skeptične i neupućene znanstvenike<sup>43</sup>. Međutim, glavni je problem u nedostatku temeljnih znanja koja re-

guliraju prihvatljivu uporabu ozona, što je rezultat nedovoljne edukacije terapeuta. Edukaciju ne čini šturo poznavanje primijenjenih doza, već i razumijevanje kako ozon djeluje te kako izbjeći toksičnost. Upravo je nepravilan rad terapeuta, često bez potrebne kvalifikacije, utjecao na negativnu predodžbu terapije ozonom u medicini. Unatoč tome, ozon se smatra jednim od najboljih dezinficijensa koji može spriječiti izbijanje infekcija i suzbijanje teških infekcija.

Posljednjih su godina učinjeni veliki napori u proizvodnji sigurnih uređaja za proizvodnju ozona i provedena brojna znanstvena temeljna i klinička istraživanja u različitim područjima u medicini, što bi moglo pridonijeti boljim terapijskim učincima. U Tablici 2. prikazan je iscrpan pregled rezultata kliničkih ispitivanja primjene ozona u medicini (Tablica 2).

**Tablica 2.** Klinička ispitivanja primjene ozona u medicini

| Cilj istraživanja  | Cilj istraživanja i veličina uzorka   | Zaključak istraživanja   | Literatura                       |
|--|---|--|----------------------------------|
| Procijena potencijalne koristi i štete ozonske terapije kao napredne intervencije za liječenje kroničnih rana na temelju metaanalize (obuhvaćene su baze Google Scholar, PubMed, Cochrane Library).              | 9 studija (n = 453 pacijenta)   | U usporedbi sa standardnom njegom, terapija ozonom kao napredni tretman za njegu rana može poboljšati udio kroničnih rana zacijeljenih u kraćem vremenu, ali potrebna su daljnja istraživanja. | Fitzpatrick i sur. <sup>44</sup> |
| Utvrđiti učinkovitost terapije ozonom za ublažavanje lumbalne boli kod odraslih pacijenata u usporedbi s drugim terapijama (steroidima i placebo).   | 6 kliničkih ispitivanja   | Terapija ozonom koja se koristi šest mjeseci za ublažavanje lumbalne boli, učinkovitija je od drugih terapija.   | Andrade i sur. <sup>45</sup>     |
| Terapija za liječenje osteoartritisa koljena: sustavni pregled randomiziranih kontroliranih ispitivanja.   | Uključeno je 11 studija s ukupno 858 pacijenata (629 žena i 229 muškaraca). | Terapija kisikom i ozonom pokazala se kao siguran pristup s ohrabrujućim učincima u kontroli boli i funkcionalnom oporavku u kratkom i srednjem roku.  | Sconza i sur. <sup>46</sup>      |
| Cilj je istraživanja provesti analizu o primjeni terapije kisikom i ozonom (OOT) u liječenju križobolje (LBP), razumjeti njezin terapijski potencijal i usporediti je s drugim dostupnim mogućnostima liječenja. | U 15 studija uključeno je ukupno 2597 pacijenata.                           | Terapija kisikom i ozonom pokazala se sigurnim tretmanom s korisnim učincima u kontroli boli i funkcionalnom oporavku pri kratkoročnom do srednjoročnom praćenju.                              | Sconza i sur. <sup>47</sup>      |
| Provjera hipoteze da bi prema mehanizmima djelovanja ozonska terapija mogla biti korisna u liječenju fibromialgije.  | 65 pacijenata (55 žena i 10 muškaraca)                                      | Pronađeno je značajno poboljšanje (> 50 % simptoma) kod 45 pacijenata (70 %). Terapija ozonom pokazala se učinkovitim tretmanom za pacijente s fibromialgijom bez značajnih nuspojava.         | Tirelli i sur. <sup>48</sup>     |

| Cilj istraživanja   | Cilj istraživanja i veličina uzorka   | Zaključak istraživanja   | Literatura                      |
|---|---|--|---------------------------------|
| Istraživanje učinaka kortikosteroida i lokalnog anestetika (CLA), plazme bogate trombocitima (PRP) i injekcija ozona (OT) na sindrom sinus tarsi.   | 60 pacijenata nasumično podijeljenih u tri terapijske skupine (CLA, PRP i OT)   | Injekcije ozona, CLA ili PRP mogle bi pružiti klinički značajno funkcionalno poboljšanje tijekom najmanje šest mjeseci kod pacijenata sa sindromom sinus tarsi.  | Toy i sur. <sup>49</sup>        |
| Procjena dobrobiti i nuspojave ozona kao adjuvantne terapije kod pacijenata s bolešću COVID-19 metaanalizom.  | 13 studija  | Povoljan učinak ozona u upravljanju bolešću COVID-19 ograničen je na poboljšanja laboratorijskih parametara kod teških pacijenata. Osim toga, nakon terapije ozonom nije zabilježen nijedan ozbiljan štetni događaj, što ukazuje na njezin visok sigurnosni profil.                                | Setyo Budi i sur. <sup>50</sup> |
| Usporedba kratkoročne i dugoročne učinkovitosti intraartikularnih injekcija (IAI) hijaluronske kiseline (HA), plazme bogate trombocitima (PRP), plazme bogate čimbenicima rasta (PRGF) i ozona (OT) u bolesnika s osteoartritisom koljena (OA). | 238 bolesnika s blagim do umjerenim osteoartritisom koljena podijeljenih u 4 terapijske skupine: IAI-HA, PRP, PRGF i OT.  | U dva mjeseca praćenja značajno poboljšanje boli, ukočenosti i funkcije primijećeno je u svim skupinama u usporedbi s početnom vrijednošću. Injekcija ozona imala je brze učinke i bolje kratkoročne rezultate nakon dva mjeseca, ali njezini terapijski učinci nisu postojali nakon šest mjeseci. | Raeissadat i sur. <sup>51</sup> |
| Usporedba kliničke učinkovitosti ozona u odnosu na intrakarpalnu injekciju metilprednizolona na bol, funkcionalni status i živčanu vodljivost u bolesnika sa sindromom karpalnog tunela (CTS) zbog sistemske skleroze (SSc).                    | 50 bolesnika s CTS-om s trajanjem SSc > 3 mjeseca podijeljeno je u skupinu O (injekcija ozona/kisika 25 µg/mL u 20 mL) ili skupinu M (metilprednizolon- acetat 40 mg i 40 mg lidokaina u 20 mL).  | I intrakarpalni ozon i metilprednizolon imaju povoljne učinke na CTS u pacijenata sa SSc. Međutim, ozon znatno više ublažava bol, poboljšava funkcionalni status šake i poboljšava provođenje <i>n. medianusa</i> u studiji koja je trajala više od šest mjeseci.                                  | Elawamy i sur. <sup>52</sup>    |
| Utvrđiti učinkovitost periferaminalne injekcije steroida zajedno s intradiskalnom ozonoterapijom u pacijenata s bolovima u križima i nogama uzrokovanim degenerativnom diskus hernijom (LDH).   | 65 bolesnika s LDH podijeljenih u dvije skupine: 1 – intradiskalna ozonska terapija (n = 35), 2 – intradiskalna ozonska terapija s periferaminalnom injekcijom steroida (n = 30).   | Ova je studija pokazala da je sama intradiskalna injekcija ozona dovoljna za liječenje boli u križima i nogama uzrokovane LDH te da periferaminalna injekcija steroida ne daje dodatnu korist.   | Ercalík i Kilic <sup>53</sup>   |
| Usporediti razlike tretmana: 1 – lokalni tobramicin 0,3 % / deksametazon 0,1 % plus kapi za oko s 2 – ozoniranim uljem zbog pretpostavljenog virusnog konjunktivitisa.  | 80 pacijenata s kliničkom dijagnozom virusnog konjunktivitisa nasumično je podijeljeno u dvije terapijske skupine od 40 pacijenata. Kontrolna je skupina primala samo topikalne kapi. Liječenje je trajalo sedam dana u objema skupinama. | Primjena kapi za oči koje sadrže ozonirano ulje u kombinaciji s lokalnim tobramicinom 0,3 % / deksametazonom 0,1 % i kapima za oči smanjuje znakove konjunktivitisa i trajanje virusne infekcije, iako ne utječe na subepitelnu infiltraciju rožnice.  | Cagini i sur. <sup>54</sup>     |

Ozon se koristi kao antibakterijski agens u različitim oblicima – kao što je ozonirana otopina soli, ozonirana voda, ozon povezan s nekim uljem ili drugim tvarima te najčešće kao plinovita smjesa kisika i ozona.

Tablica 3 pokazuje da se ozon može primjenjivati velikom fleksibilnošću, ali ga se ne smije ubrizgavati intravenski kao plin zbog rizika od poticanja kisikove embolije, s obzirom na činjenicu da plinska smjesa uvijek sadrži najmanje 95 % kisika<sup>43</sup>.

**Tablica 3.** Putevi/način unosa ozona<sup>2</sup>

| Parenteralno  |
|---|
| Intravenski, intraarterijski, <sup>a</sup> intramuskularni, supkutani, intraperitonealni, intrapleuralni, intraartikularni, periartikularni, miofascijalni, intradiskalni, intraforaminalni, intralezionalni <sup>b</sup> |
| Lokalno ili lokoregionalno  |
| Nazalno, <sup>c</sup> tubarno, <sup>c</sup> aurikularno, oralno, <sup>c</sup> vaginalno, uretralno i unutar mjehura, rektalno, kožno, zubno   |

<sup>a</sup> Više se ne koristi za ishemiju ekstremiteta. Metastaze u jetri mogu se embolizirati putem jetrene arterije; <sup>b</sup> Intratumoralno ili putem fistule; <sup>c</sup> Izvoditi tijekom apneje 30-40 sekundi

Neka su istraživanja dokazala da se primjenom ozona povećava osjetljivost mikroorganizama na antibiotike i povećava učinkovitost imunskog sustava u liječenju infektivnih stanja. Ozon se zbog toga može primijeniti u kombinaciji s antibioticima već na samom početku liječenja kako bi se povećala učinkovitost terapije antibioticima<sup>42, 55</sup>.

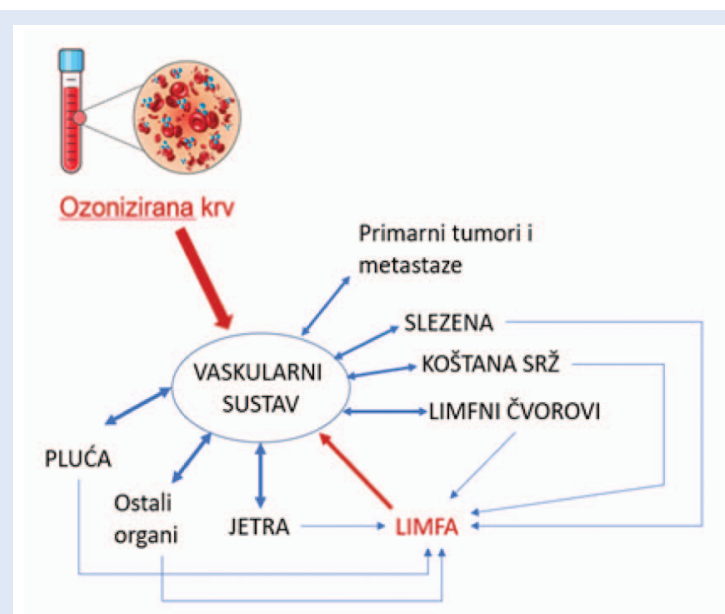
Brojni znanstveni dokazi pokazuju da su aktivacija hipoksije putem inducibilnog faktora 1  $\alpha$  (engl. *hypoxia-inducible factor 1-alpha*; HIF-1 $\alpha$ ), nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica (engl. *nuclear factor of activated T-cells*; NFAT), nuklearnog faktora eritroid 2 faktora 2 vezanog na antioksidativni odgovor (engl. *nuclear erythroid 2-related factor 2 that bind to the antioxidant response element – ARE*, Nrf2-ARE) te putevi aktivatora proteina 1 (engl. *activator protein 1*; AP-1) glavni molekularni mehanizmi na kojima se temelji terapijski učinak terapije ozonom<sup>30-32</sup>. Aktivacija ovih molekularnih putova dovodi do povećane regulacije endogenih antioksidativnih sustava, aktiviranja imunoloških funkcija, kao i suzbijanja upalnih procesa. Nakon liječenja ozonom uočeno je (1) povećanje razine endogenih antioksidansa, (2) indukcija antioksidativnih enzima, (3) povećana sinteza hem-oksigenaze 1, (4) supresija mRNA ekspresije endotelina-1, (5) obnovljena ravnoteža NO/O<sub>2</sub> u endotelu i (6) inhibicija oslobađanja upalnih citokina<sup>56</sup>.

Kao što je već navedeno, ozon svojim oksidacijskim djelovanjem može suzbiti rast pojedinih bakterija napadom na molekularnu strukturu njihovih membrana i mijenjajući aktivnost enzima. Ovaj mehanizam sličan je onome koji koriste bijele krvne stanice, leukociti, u procesu fagocitoze bakterija, a ekstremno je efikasan i protiv virusa, gljiva, lišajeva i drugih štetnih tvari<sup>57</sup>.

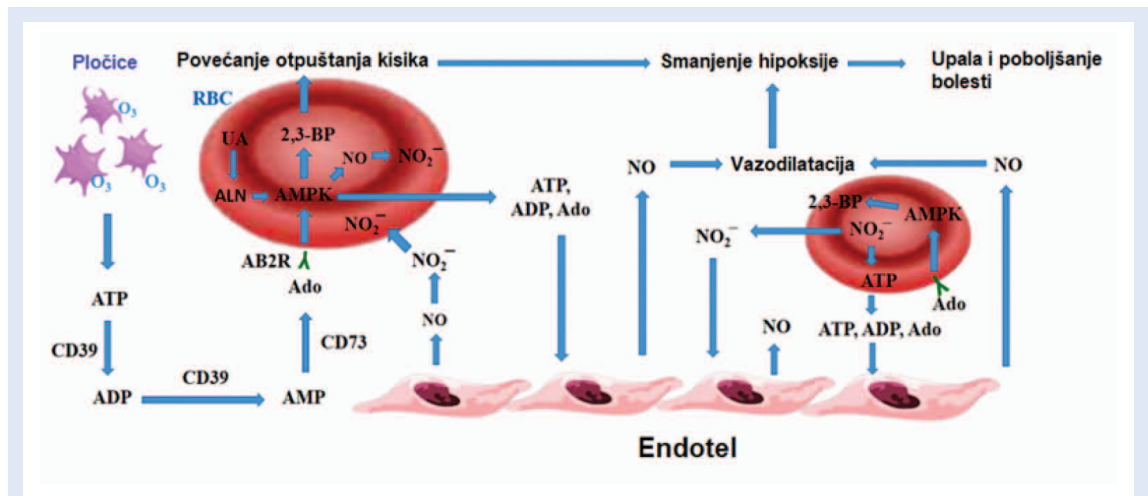
## TERAPIJA OZONOM

### Autohemoterapija ozonom i liječenje vaskularnih oboljenja

Autohemoterapija ozonom uključuje tretiranje pacijentove venske krvi ozonom *ex vivo*, odnosno smjesom O<sub>3</sub>-O<sub>2</sub> (smjesa sadrži 97 % kisika i 3 % ozona), te se potom ona opet vraća u pacijenta, najčešće intramuskularno (Slika 8). Smatra se kako tretiranje krvi ozonom ima terapijske učinke na probleme s cirkulacijom, virusna oboljenja i tumore<sup>58</sup>. Autohemoterapija se u zadnjih tridesetak godina koristila u liječenju mnogih ne-



**Slika 8.** Ozonirana se krv nakon reinfuzije u bolesnika darivatelja raznosi po cijelom organizmu. Eritrociti nastavljaju cirkulirati u krvožilnom sustavu isporučujući više kisika u ishemijska područja, dok leukociti, migrirajući kroz postkapilarne venule u različite organe, polako izazivaju imunološki odgovor. Trombociti će otpustiti svoj hormonski sadržaj u krv i nestati. Ponovno vraćeni ozonirani produkti lipida (LOP) razrjeđuju se u smjesi plazme i intersticijske tekućine te cijelom tijelu prenose poruku akutnog oksidacijskog stresa.



**Slika 9.** Mehanizmi poboljšanja oksigenacije tkiva izazvani autohemoterapijom ozonom i povezani dobrobitima u sustavu<sup>77</sup> (licencija preuzete slike Creative Commons CC BY 4.0.)

$\text{NO}_2^-$  – nitritni anion; 2,3-BP – 2,3-bisfosfoglicerol; Ado – adenozin; UA – mokraćna kiselina; ALN – alantoin

zaraznih i zaraznih bolesti. Kao pomoćna terapija koristila se u liječenju tuberkuloze<sup>59</sup>, virusnih infekcija, alergije i bolesti perifernog živčanog sustava<sup>60</sup>.

Ozon može učinkovito djelovati na stanice udaljenije od mjesta njegove primjene smanjenjem sustavne hipoksije i upale<sup>43, 61–63</sup>. Hipoksija tkiva uključena je u patogenezu fizioloških poremećaja kao što su pretilost, ateroskleroza, kronična bubrežna bolest, nealkoholna masna bolest jetre i rak<sup>64–70</sup>. Hipoksija aktivira monocite, makrofage i dendritične stanice za poticanje upale<sup>71–73</sup>. Također, povećava jetrenu glukoneogenezu, glikolizu i sintezu lipida prekomjernom ekspresijom inducibilnog faktora hipoksije alfa (engl. *hypoxia-inducible factor-2 alpha*; HIF-2 $\alpha$ ) u hepatocitima<sup>74–76</sup>. Prekomjerna glukoneogeneza potiče hiperurikemiju i dislipidemiju kao prekursore višestrukih poremećaja.

Slika 9 prikazuje kako ozon primijenjen na ovaj način modulira funkciju eritrocita za promicanje signalizacije dušikovog oksida/nitrita i oksigenacije tkiva, što dovodi do višestrukih koristi<sup>77</sup>.

Nerazumijevanje mehanizma djelovanja onemogućilo je širu primjenu autohemoterapije ozonom iako je ovakav pristup liječenju pokazao pozitivne rezultate. Ključ razumijevanja autohemoterapije kao potencijalnog tretmana za mnogobrojne bolesti leži upravo u heterogenosti krvi. Smatra se da postoji korelacija između izloženosti tretmanu

ozonom te biokemijskim i imunološkim promjenama koje nastaju u krvi. Istraživanja koja su provedena 1994. te kasnije 2011. i 2022. godine, fokusirala su se na ulogu svake pojedine sastavnice krvi, čiji se rezultati opisuju u nastavku.

Autohemoterapija ozonom postiže pozitivne rezultate u liječenju krvožilnih bolesti<sup>58</sup>. Pored toga, ozon se primjenjuje kod infekcije rana, poremećaja cirkulacije, gerijatrijskih stanja, makularne degeneracije, virusnih bolesti, reumatizma/artritis, raka, SARS-a i AIDS-a<sup>78–81</sup>.

Smatra se da su upravo eritrociti glavna meta ozona jer zauzimaju veliki volumni udio krvnog uzorka. Ozon se raspada u vrlo kratkom vremenu i stvara već spomenute reaktivne spojeve koji se prvo djelomično eliminiraju pomoću antioksidansa iz krvne plazme. Preostali reaktivni spojevi potom tek djeluju oksidirajuće na fosfolipide, glikolipide i glikoproteine stanične membrane, a ponekad djeluju na način da inaktiviraju unutarstanične enzime i DNA. Učinak ozona na eritrocite stoga uvelike ovisi o koncentraciji ozona i njegovoj izloženosti antioksidansima iz plazme<sup>82</sup>. Mehanizmi kojima ozonirana krv može poboljšati cirkulaciju i oksigenaciju hipoksičnih tkiva, jesu kombinacija poboljšanja protočnosti krvi zbog veće fleksibilnosti eritrocita, izlučivanja ATP-a koji uzrokuje vazodilataciju te izlučivanja drugih pozitivnih agensa poput eikosanoida, dušikovih oksida, angiogenih i/ili faktora rasta i dr.

Biokemijski, terapija ozonom dovodi do aktivacije glikolize s porastom koncentracija adenosin-trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*; ATP) i 2,3-difosfoglicerola (engl. *2,3-diphosphoglycerate*; 2,3-DPG). Nastavno, sigmoidna krivulja prikaza reakcije vezanja kisika za hemoglobin pomiče se u desno i povećava razinu otpuštanja kisika u tkiva<sup>58</sup>.

Dokazano je da ozon u prihvatljivim koncentracijama može umjereno poticati stvaranje citokina, pa se na tome i temelji njegova uspješnost u liječenju akutnih i kroničnih virusnih oboljenja i neoplazija. Ozon pojačava fagocitnu i baktericidnu aktivnost leukocita. Uz to pozitivno djeluje na proizvodnju imunoglobulina čime jača i stečeni imunološki sustav. Osim toga, ozon može aktivirati i monocite i limfocite te na taj način inducirati proizvodnju citokina kao što su IL-1, interferon beta (engl. *interferon beta*; IFN- $\beta$ ), interferon gama (engl. *interferon gamma*; IFN- $\gamma$ ), faktor stimulacije granulocitno–makrofagnih kolonija (engl. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; GM-CSF), TNF- $\alpha$  i faktor tumorske nekroze beta (engl. *tumor necrosis factor beta*; TNF- $\beta$ ). Tijekom svake terapije ozonom, izazvana blaga imunostimulacija odnosi se na samo oko 4 % limfocita i monocita prisutnih u krvi koji su izloženi ozonu *ex vivo*<sup>1</sup>.

Biokemijski, u monocitima i limfocitima H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktivira tirozin-kinazu koja fosforilira inhibitor nuklearnog faktora  $\kappa$ B (engl. *inhibitor of nuclear factor kappa B*; I $\kappa$ B), dio nuklearnog faktora  $\kappa$ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*; NF- $\kappa$ B). Fosforilirani I $\kappa$ B proteina izdvaja se i degradira u proteosomu, a ostatak se p50-p60 heterodimera premješta u jezgru gdje može aktivirati i oko 100 gena među kojima su i oni za sintezu i otpuštanje citokina poput IFN- $\gamma$  i IL-8<sup>83, 84</sup>.

Povezanost trombocita i ozona još uvijek nije utvrđena iako se uvidjela povišena koncentracija citokina transformirajućeg faktora rasta beta 1 (engl. *transforming growth factor beta 1*; TGF $\beta$ 1) u plazmi, ali to je moguće povezati i s djelovanjem limfocita<sup>58</sup>. Tijekom autohemoterapije detekcija podjedinice B-faktora rasta izvedene iz trombocita (engl. *platelet-derived growth factor subunit B*; PDGF-B), TGF- $\beta$ 1, IL-8 i epidermalnog faktora rasta (engl. *epidermal growth factor*;

EGF), oslobođenih u hepariniziranoj plazmi u količinama ovisnim o dozi ozona, nije bila iznenađujuća jer su trombociti iznimno osjetljivi na progresivni akutni oksidativni stres. Povećana razina ovih faktora rasta u cirkulaciji može imati blagotvoran učinak na poboljšanje oporavka problema povezanih s dijabetičkim stopalom ili PAD-om (perifernim arterijskim bolestima)<sup>85, 86</sup>.

Nije utvrđeno je li utjecaj ozona na polimorfonuklearne stanice direktan ili indirektan, ali svakako se dokazalo da neutrofilni ili eozinofili kao odgovor na stimulaciju izlučuju mnogobrojne citokine koji kasnije imaju utjecaja na cjelokupni imunski odgovor organizma<sup>58</sup>.

Ne postoje informacije o direktnoj ili indirektnoj aktivaciji/inaktivaciji lipoproteina i koagulacijskih faktora plazme djelovanjem ozona<sup>58</sup>.

Autohemoterapija ozonom treba malu količinu administriranog pripravka te su zbog toga simptomi nakon njegove primjene blagi, ali je imunološki učinak progresivan zbog staničnih interakcija koje su vrlo slične onima u fiziološkim procesima imunološkog sustava<sup>1</sup>. Osim antivirusnog djelovanja, autohemoterapija se često koristi u liječenju vaskularnih oboljenja zbog poboljšanja cirkulacije i dotoka kisika djelovanjem na eritrocite, odlične dezinfekcijske osnove, regulacije antioksidativnih enzima i zanemarivih nuspojava prilikom liječenja<sup>87</sup>.

#### PRIMJENA OZONA U VIRUSNIM OBOLJENJIMA

Važna primjena O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> terapije odnosi se na virusne bolesti. Iako su protivirusne i protumikrobne značajke ozona već dobro poznate, mehanizmi kojima oni djeluju na njih i dalje nisu u potpunosti jasni. Pretpostavlja se kako utjecaj imaju mnogobrojne makromolekule<sup>88</sup>.

U interakciji s virusnom kapsidom, produkti reakcije ozona i lipida (LOP), nastali djelovanjem O<sub>3</sub>, izazivaju peroksidaciju glikoproteina i lipida, što dovodi do slabosti virusa obloženog lipidima i do drastičnog smanjenja virusnog opterećenja<sup>89, 90</sup>. Međutim, glavni mehanizam farmakološke antivirusne aktivnosti ozona povezan je sa sposobnošću ROS i LOP da pri niskim dozama izazivaju blagu unutarstaničnu i mitohondrijalnu signalizaciju posredovanu oksidacijskim stresom, koji

može biti okidač za antioksidanse, odgovoriti protuupalno i antitrombogeno<sup>91</sup>. Na taj se način procesom hormeze, odnosno mitohormeze, odgađa oštećenje organa u modelima ishemije ili reperfuzijske ozljede, oštećenja endotela, prigušivanja trombotičkih mehanizama i podržavanja kardiovaskularne zaštite<sup>91</sup>.

Iako postoje brojni dokazi o antimikrobnoj primjeni ozona, ovdje će se opisati primjena terapije ozonom u oboljelih od virusa SARS-CoV-2.

Koronavirusi su veliki RNA virusi, sfernog oblika s prepoznatljivim špicastim strukturama i S-proteinima koji se uglavnom sastoje od aminokiselina – cisteina i triptofana. Oni napadaju životinje i ljude, a do sada je poznato sedam ljudskih sojeva (229E, NL63, OC43, HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2 ili 2019-nCoV). U 21. stoljeću došlo je do otkrića triju novih sojeva koji uzrokuju teže respiratorne probleme, a jedan od njih je i aktualni SARS-CoV-2 koji uzrokuje bolest COVID-19<sup>91, 92</sup>. SARS-CoV-2 je iznimno infektivan virus s visokom stopom transmisije kapljičnim putem. COVID-19 je bolest nalik pneumoniji koja može biti pogubna za stariju populaciju, ali i za imunokomprominirane osobe. Do današnjeg dana ne postoji apsolutno efektivan tretman za liječenje bolesti COVID-19, ali kako bi se spriječilo daljnje širenje virusa, krenulo se u program cijepljenja cjepivima protiv virusa SARS-CoV-2<sup>92</sup>.

Trenutno se provodi oko 80 kliničkih ispitivanja kako bi se definirala najbolja terapija za liječenje infekcije virusom SARS-CoV-2, a od njih samo se tri baziraju na ozonu kao potencijalnom lijeku<sup>92</sup>.

Ozon ima mnogobrojna svojstva koja bi mogla pomoći u liječenju infekcije COVID-19 te bi različita svojstva mogla pridonijeti liječenju u različitim stadijima infekcije. Prema Fernándezu-Cuadrosu i sur.<sup>91</sup> postoje četiri glavna razloga primjene ozona:

- *Ozon je sposoban direktno inaktivirati mnogobrojne viruse.* Koronavirusi imaju regije bogate cisteinom i triptofanom u svom membranskom S-proteinu. Ozon bi svojim oksidacijskim djelovanjem mogao izravno oksidirati tiolne (R-S-H) skupine cisteina i triptofana u oksidirani oblik R-S-S-R inaktivirajući ih i izravno blokirati njihovu staničnu fuziju<sup>98</sup>. Indirektno, pomoću svojih glasnika kao što su ROS/RNS ( $H_2O_2$ , superoksid, dušikov oksid, itd.) ili LOP, ozon i da-

lje zadržava svoju oksidacijsku moć inaktivacije virusa. Ako ozon procesom peroksidacije oštećuje kapsidu, mijenja se reproduktivni ciklus virusa – u tome bi bio terapijski učinak ozona u početnoj fazi rane infekcije<sup>92, 93</sup>.

- *Putem sekundarnih glasnika ( $H_2O_2$ ), ozon stimulira staničnu i humoralnu imunost preko signalnih puteva nuklearnog faktora aktiviranih T-stanica (NFAT) i aktiviranog proteina 1 (AP-1)*<sup>91</sup>. Signalni putevi NFAT i AP-1 u konačnici dovode do izlučivanja upalnih citokina (IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$ ) koji će proizvesti upalu i na mjesto upale privući neutrofile, limfocite i makrofage koji na mjestu upale provode fagocitozu i ograničiti infekciju na toj razini, suzbijajući lokalne patogene. Ovo svojstvo ozona omogućilo bi djelovanje u fazi virusnog odgovora virusne infekcije<sup>92, 93</sup>.
- *U terapijskim dozama ozon modulira nuklearni eritroidni faktor 2 povezan s faktorom 2 (Nrf2) i nuklearni faktor kapa beta (NF- $\kappa$ B) i inducira rebalans antioksidacijskog okruženja.* Nrf2 ključni je transkriptor koji potiče izlučivanje antioksidativnih enzima koji su zaduženi za eliminaciju ROS-ova. NF- $\kappa$ B promovira pojačanu aktivnost mitohondrijske NADPH oksidaze koja je glavni izvor endogenog superoksidnog anionskog radikala. Disbalans između tih dvaju nuklearnih faktora dovodi do velikog broja oboljenja među kojima je i COVID-19. Ozon ima mogućnost djelovanja na ta dva faktora na način da smanjuje koncentraciju proupalnih citokina, a stimulira proizvodnju protuupalnih, čime smanjuje efekt citokinske oluje<sup>94-96</sup>.
- *Ozon može poboljšati cirkulaciju i perfuziju pluća i drugih organa u stanju hipoksije.* Ozonirani eritrociti potiču glikolizu i povišuju razinu proizvedenog ATP-a i 2,3-DPG-a koji pomiču krivulju vezanja kisika za hemoglobin u desno i potiču puštanje kisika u ishemična tkiva. Na taj način, oboljelima od bolesti COVID-19 terapija ozonom pomogla bi u hiperinflamatornoj fazi i otkazivanju organa<sup>92</sup>.

Prema istraživanju Franzini i sur.<sup>97</sup> na 50 inficiranih muških osoba starijih od 60 godina, terapija kisik-ozon ( $O_2-O_3$ ) putem autohemolize pokazala je značajne pozitivne rezultate, od kojih se ističe mogućnost terapije da smanji duljinu oporavka

pulmonarnih parametara na normalne razine u manje od 10 dana.

#### PRIMJENA OZONA U KOMBINACIJI S ANTIBIOTICIMA ZA LIJEČENJE SEPSE

Sepsa je definirana kao po život opasna disfunkcija organa uzrokovana nereguliranim odgovorom domaćina na infekciju. Patologija sepse uključuje kompleksne interakcije između organa domaćina i patogena. Ultimativno dolazi do oštećenja tkiva i otkazivanja organa zbog negativnih utjecaja sistemske aktivacije imuniteta. Eksperimentalna studija Kapicibašija i sur.<sup>98</sup> o utjecaju antibiotika i kombinacije antibiotika i ozona kod sepse izazvane bakterijom *E. coli* na štakorima utvrdila je da nema pozitivnog učinka na histopatologiju pluća te da je u ovom slučaju poželjnije liječenje samo antibioticima<sup>98</sup>. U istraživanju utjecaja terapije ozonom i antibiotskog liječenja sepse na proupalne i protuupalne citokine na modelu sepse endotoksinom *E. coli*, Tüfekçi i sur.<sup>99</sup> utvrdili su da bi ozon dodan antibiotskoj terapiji kod sepse mogao imati pozitivan učinak na preživljavanje suzbijanjem upalnog procesa.

#### PRIMJENA OZONA U LIJEČENJU DIJABETIČKOG STOPALA

Ulkusi na stopalima imaju incidenciju od 4 do 10 % u pacijenata sa šećernom bolesti (*diabetes mellitus*), pa od tuda i naziv dijabetičko stopalo. Ovakav oblik ulkusa naziva se još i neurotropna ulceracija jer do nje dolazi oštećenjem živaca perifernog živčanog sustava zbog čega pacijent ne može više pomicati stopalo, nema osjeta u njemu, a svi ti čimbenici dalje pridonose oštećenju tkiva i razviku ulkusa. Ako se ne liječi pravovremeno, može doći do neuropatskih i vaskularnih komplikacija koje mogu dovesti do razvoja gangrene ili pak u najgorem slučaju, amputacije cijelog stopala<sup>100-102</sup>. Mnogobrojne studije pokazale su kako se ozonirana voda, kao i ozonirana ulja mogu koristiti kao dezinficijensi i stimulansi oporavka oštećenoga tkiva. Uz to, O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> tretman može poboljšati razine vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*; VEGF), TGF-β i PDGF-α. Porast navedenih faktora, a posebice TGF-β, može dovesti do izlječenja lokalizirane gangrene i obnove tkiva. Ozon uzrokuje agregaci-

ju trombocita te uz izlučivanje pojedinih faktora rasta također pridonosi bržem zarastanju ulkusnih rana. Nadalje, kada se ozon primjeni na ulkus, dolazi do eliminacije patogena i O<sub>2</sub> potiče proliferaciju fibroblasta, što pomaže u ponovnoj izgradnji unutarstaničnog matriksa i zarastanju područja oko ulkusa<sup>103</sup>.

#### PRIMJENA OZONA U LIJEČENJU RAKA

Tijekom nekoliko desetljeća prestižni časopisi objavljivali su studije *in vitro* i *in vivo* o sposobnosti ozona da izazove izravno oštećenje tumorskih stanica te da, također, pojača učinke radioterapije i kemoterapije. Terapija ozonom, zbog već navedenih jakih oksidacijskih svojstava, u novije se vrijeme primjenjuje kao dopuna konvencionalnoj terapiji citostaticima zbog poticanja imunosnog sustava, što urođenog, što stečenog, ali i zbog regeneracije tkiva uslijed vazodilatacije, dovođenja kisika tkivu, ali i poticanja izlučivanja mnogobrojnih faktora s povoljnim učinkom na regeneraciju tkiva. Na taj način primjena ozona pruža dodatnu potporu potencijalnim korisnim učincima tijekom liječenja raka<sup>104-107</sup>.

Međutim, potrebna su daljnja istraživanja, kao što su randomizirana klinička ispitivanja, kako bi se pokazala njegova potencijalna korisnost kao pomoćnog terapijskog alata. Za moguću primjenu u liječenju raka ozonom Clavo i sur.<sup>104</sup> navode bitne preporuke: a) terapija ozonom nikada se ne bi smjela koristiti kao zamjena za već utvrđene onkološke tretmane; b) terapija ozonom trebala bi uvijek biti komplementarna konvencionalnom tretmanu u suradnji s onkologom i drugim specijalistima odgovornim za zdravstveno stanje pacijenta; c) pacijentu uvijek treba prije početka liječenja prikazati detaljne i istinite informacije iz studija koje govore o potencijalnoj koristi korištenja ozona u terapiji tumora; d) prije terapije potreban je pisani pristanak pacijenta.

#### PRIMJENA OZONA U DERMATOLOGIJI

Terapija ozonom može se postići korištenjem ozonirane hidroterapije, ozoniranog ulja, ozonske autohemoterapije i drugih inovativnih oblika doziranja ozonskih proizvoda kao što su emulzije na bazi ozoniranih ulja, mikroemulzije i nanoemulzije te enkapsulirane emulzije<sup>108-111</sup>. Ozon se često



koristi kao dopunska terapija za razne kožne bolesti, uključujući zarazne kožne bolesti, zacjeljivanje rana, ekceme, dermatitis, psorijazu, aksilarnu osmidrozu, dijabetičko stopalo i dekubituse<sup>112-114</sup>. Osim toga, nekoliko je studija izvijestilo o superiornom potencijalu terapije ozonom za poboljšanje mikrobioma kože i crijeva, kao i za antitumorsko liječenje i usporavanje starenja. Terapija ozonom nova je strategija liječenja koja djeluje preko složenih mehanizama, uključujući antioksidativne učinke, imunomodulacijski kapacitet i modulaciju lokalne mikrocirkulacije. Studije koje procjenjuju mehanizam ozona postupno su se proširile posljednjih godina<sup>115-119</sup>.

#### **Hidroterapija ozonom**

Ovaj oblik terapije odnosi se na otopljeni ozon u vodi u kojoj na temelju lokacije, opsega i drugih povezanih stanja specifičnih kožnih lezija, kao i za dijagnozu i liječenje, operater može odabrati različite metode, uključujući debridman, namakanje i mokru kompresiju. Hidroterapija ozonom nema ograničenja i pogodna je za sve uzraste i koristi se za liječenje mnogobrojnih oboljenja kože uzrokovanih bakterijama, virusima i gljivicama, ali i za dermatoze poput ekcema, atopičnog dermatitisa i dr.<sup>112-114</sup>. Transkutane kupke ozonom najčešće su u lokalnoj primjeni liječenja vanjskih rana pri niskom tlaku (ispod atmosferskog) u zatvorenom sustavu koji jamči da O<sub>3</sub> ne izlazi u okolni zrak<sup>120</sup>. Ozonirana voda, u spreju ili kao oblog, primjenjuje se u dentalnoj medicini i dezinfekciji<sup>121, 122</sup>.

#### **Ozonirana ulja**

U ozoniranim uljima, ozon je otopljen u nezasićenim masnim kiselinama za topikalnu primjenu. Ozon oksidira nezasićene masne kiseline u 1,2,4-trioksolan, postupno otpuštajući O<sub>3</sub> na po-

vršini kožnih lezija<sup>117</sup>. Međutim, uslijed nekontrolirane peroksidacije, opetovana lokalna primjena ozoniranog ulja može rezultirati prekomjernom koncentracijom ozona u kožnoj leziji, povremeno izazivajući iritantnu bol. Ozonirano ulje može pospešiti zacjeljivanje rana<sup>118</sup> i lokalno liječiti atopijski dermatitis<sup>114</sup>, psorijazu<sup>115</sup> površinske bakterijske infekcije<sup>123</sup> i gljivične infekcije<sup>124</sup>.

#### **O<sub>3</sub>-autohemotransfuzija (OAHT)**

Za liječenje sistemskih oboljenja najčešće se primjenjuje već spomenuta autohemotransfuzija ozonom koja ima potencijalno antimikrobno djelovanje, aktivira imunosni sustav, stimulira oporavak rana, popravlja metabolizam eritrocita i regulira tjelesni antioksidativni kapacitet. Kako bi se smanjile moguće nuspojave, Di Paolo i sur.<sup>125</sup> predložili su sigurnosni standard za OAHT. Terapeutska koncentracija ozona za OAHT trebala bi se kretati između 10 i 80 µg/mL<sup>126</sup>. Stoga OAHT treba započeti niskom dozom, a odgovor bolesnika treba pomno pratiti. Trenutno se OAHT smatra dopunskom terapijom za dijabetičko stopalo, određene tumore, herpes zoster i neke autoimune bolesti kao što je eritematozni lupus.

### **PRIMJENA OZONA U DENTALNOJ MEDICINI**

U dentalnoj medicini ozon se može koristiti kao plin ili otopljen u vodi za sprječavanje rasta bakterija, poboljšanje homeostaze i povećanje lokalne opskrbe kisikom povećanjem protoka krvi, za liječenje bolesti kao što su herpes i afte. Terapija ozonom ubrzava proces ozdravljenja i skraćuje klinički tijek bolesti. Najčešće se primjenjuje u obliku ozonirane vode ili ulja. Tablica 4 prikazuje nedavne kliničke studije u kojima je primijenjena terapija ozonom.

**Tablica 4.** Klinička ispitivanja primjene ozona u dentalnoj medicini

| Cilj istraživanja   | Cilj istraživanja i veličina uzorka | Zaključak istraživanja                            | Literatura                  |
|---|-------------------------------------|---|-----------------------------|
| Usporediti učinke laserske fotobiomodulacije (PBM) i topikalne terapije ozonom na reepitelizaciju rana na donorskom mjestu nepca putem kliničke procjene i računalno potpomognute analize slike te procjene morbiditeta pacijenata nakon operacije slobodnog gingivalnog transplantata (FGG). | 36 pacijenata                       | Značajno poboljšava cijeljenje palatalnih lezija. | Isler i sur. <sup>127</sup> |

| Cilj istraživanja  | Cilj istraživanja i veličina uzorka   | Zaključak istraživanja   | Literatura                         |
|--|---|--|------------------------------------|
| Procijeniti učinkovitost izbjeljivanja zuba u ordinaciji nakon primjene ozona (O <sub>3</sub> ) ili vodikovog peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).  | 32 pacijenta  | Slični rezultati izbjeljivanja dobiveni su s ozonom i vodikovim peroksidom.  | Al-Omiri i sur. <sup>128</sup>     |
| Procijeniti kliničku i mikrobiološku učinkovitost primjene ozona u neizravnoj terapiji pulpe u dvjema posjetama.   | Uključeno je 105 prvih donjih kutnjaka s dubokom karijesnom lezijom nasumično raspoređenih u tri skupine (kontrola, 2 % klorheksidin- diglukonatom (CHX), primjena ozona).                | Indirektna terapija pulpe u dvjema posjetama dala je uspješne rezultate za sve ispitivane skupine i značajno smanjenje mikroorganizama. Međutim, CHX bi bio povoljniji zbog poboljšanja uspjeha liječenja.   | Durmus i sur. <sup>129</sup>       |
| Primijeniti ozon kao dopunsku terapiju kroničnog parodontitisa: klinički, mikrobiološki i biokemijski aspekti.   | 18 pacijenata (9 muškaraca i 9 žena) s kroničnim periodontitisom (GCP)  | Dodatna terapija ozonom nije pružila dodatne prednosti kliničkim, mikrobiološkim i biokemijskim parametrima u odnosu na skaliranje i planiranje korijena (SRP) u bolesnika s kroničnim parodontitisom.   | Uraz i sur. <sup>130</sup>         |
| Ispitati učinak ozona, zračenja diodnim laserom i prisutnosti zbijenosti/razmaka zuba na percepciju boli kod ortodontskog pacijenta.   | 76 pacijenata   | Diodni laseri imali su značajan učinak na ublažavanje boli, dok ozon nije ublažavao bol.   | Matys i sur. <sup>131</sup>        |
| Istražiti i procijeniti učinkovitost triju metoda remineralizacije cakline na početni aproksimalni karijes: (1) nanohidroksiapatitnog gela, (2) terapija plinskim ozonom, (3) kombinacija nanohidroksiapatitnog gela i ozona.  | Početne aproksimalne lezije cakline na pretkutnjacima i molarima (n = 546), nasumično raspoređene u tri skupine   | Kombinacija nanohidroksiapatitnog gela i ozonske terapije dala je najbolji učinak u remineralizaciji cakline.  | Grocholewicz i sur. <sup>132</sup> |
| Procijeniti bol nakon tretmana i potrebu za liječenjem korijenskog kanala nakon uporabe tradicionalne metode uklanjanja karijesa praćene restauracijom ili nakon ozonske metode konzervativnijeg liječenja dubokog karijesa i restauracije.  | 84 pacijenta  | Ozon koji se nanosi na djelomično izrezane šupljine prije popravka, ublažava bol.  | Al-Omiri i sur. <sup>133</sup>     |
| Procijeniti lokalni učinak plinovitog ozona na bakterije u dubokim karijesnim lezijama nakon nepotpunog uklanjanja karijesa te istražiti njegov učinak na vaskularni endotelni faktor rasta pulpe (VEGF), neuronalnu sintazu dušikovog oksida (nNOS) i superoksid-dismutazu (SOD). | 38 trajnih zuba podijeljenih u dvije skupine – kontrolnu skupinu čini terapija klorheksidom   | Antibakterijski učinak ozona na rezidualne bakterije nakon nepotpunog uklanjanja karijesa bio je sličan učinku 2 % klorheksidina. Učinak ozona na pulpu VEGF, nNOS i SOD ukazuje na njegovu biokompatibilnost. Ozon je učinkovit i biokompatibilan dezinficijens kaviteta u liječenju dubokih karijesnih lezija tehnikom nepotpunog uklanjanja karijesa. | Krunić i sur. <sup>134</sup>       |
| Procijeniti učinke fotobiomodulacijske terapije (PBM) i primjene ozona na kvalitetu života pacijenata nakon gingivektomije i gingivoplastike.  | 36 pacijenata s kroničnim upalnim povećanjem gingive podvrgnuto je gingivektomiji i gingivoplastici. Skupine su nasumično podijeljene u kontrolnu (n = 12), PBM (n = 12) i ozon (n = 12). | Primjene PBM-a i ozona nakon gingivektomije i gingivoplastike smanjuju razinu boli i pozitivno utječu na kvalitetu života pacijenata.  | Uslu i sur. <sup>135</sup>         |

### Učinak ozona na meka i tvrda zubna tkiva

Ozonirana voda koristi se za dezinfekciju, zaustavljanje krvarenja, čišćenje rana u kostima i mekom tkivu, dovođenje kisika na mjesto oštećenja tkiva, kao i kod povišenja temperature na mjestu rane gdje potom metaboličkim procesima rana brže zacjeljuje. Prikladna je za primjenu kao vodica za ispiranje usta, sprej za čišćenje pojedinih dijelova usne šupljine ili ispiranje u mlazu za teško dostupna mjesta. Ozonirana voda ili ulja mogu se nanositi na lezije mekog tkiva kao što su herpes, veći i manji aftozni stomatitis, čirevi na pokretnim protezama, angularni heilitis, kandidijaza, traumatske rane<sup>136</sup>. Osim toga, uporaba ozona dobro je poznata u svim stadijima gingivalnih i parodontnih bolesti zbog njegovih korisnih bioloških učinaka, antimikrobnog djelovanja, oksidacije preteča biomolekula i mikrobnih toksina u parodontnim bolestima te njegova svojstva zacjeljivanja i regeneracije tkiva<sup>137</sup>.

Neke od studija koje su sada dostupne, procijenile su kako ozon utječe na otvoreni karijes, nekavitirane okluzalne karijesne lezije, karijes jamica i fisura te primarni karijes korijena. Uz kratkoročno praćenje, rezultati su pokazali značajno smanjenje broja mikroorganizama u karijesnim lezijama *in vivo* i *in vitro*<sup>138-141</sup>. Kako bi se spriječila ili odgodila potreba za popravkom zuba, može se privremeno zaustaviti napredovanje karijesa u caklini ili dentinu<sup>142</sup>. U uporabi je u endodontskoj terapiji za suzbijanje sojeva bakterija poput *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans*<sup>143, 144</sup>. Primjena ozona smanjuje preosjetljivost dentina<sup>145</sup> i pomaže ponovnom rastu kostiju u implantologiji jer smanjuje rizik od infekcija i jača ponovni rast<sup>146</sup> te onemogućava infekciju oko implantata u slučajevima periimplantitisa<sup>147</sup>.

### Utjecaj ozona na svojstva cakline i dentina te na liječenje nekavitiranih karijesa i fisura

Floare i sur.<sup>147</sup> pokazali su da je izloženost ozonu u trajanju 40 – 50 sekundi povećala mikrotvrdoću cakline i osigurala stopu remineralizacije između 96,82 i 97,38 %. Kliničke studije pokazale su da nanohidroksiapatitni gel i ozonska terapija te njihova kombinacija poboljšavaju sposobnost remineralizacije<sup>148</sup>.

U liječenju karijesnih lezija nekavitiranih okluzalnih fisura u prvim trajnim molarima Meligy i

Almushayt ispitivali su učinkovitost plina ozona i sredstva za brtvljenje fisura te su utvrdili da je ozon jednako koristan kao i sredstvo za brtvljenje fisura 12 mjeseci nakon liječenja prvih trajnih kutnjaka s aktivnim, nekavitiranim karijesnim lezijama okluzalnih fisura<sup>149</sup>.

Međutim, neka istraživanja pokazuju neučinkovitost ozona u zaustavljanju karijesa i smanjivanju bakterija u otvorenim okluzalnim karijesnim lezijama. Dok su neki istraživači tvrdili da terapija ozonom ima malo ili nimalo utjecaja na preživljavanje bakterija, drugi su tvrdili da je prilično učinkovita u uništavanju gram-pozitivnih i gram-negativnih oralnih bakterija. Stoga su potrebna dodatna istraživanja prije nego što se ozon odobri kao zamjena za trenutne pristupe liječenju i prevenciji karijesa.

Santos i sur.<sup>150</sup> proveli su sustavni pregled i meta-analize s ciljem istraživanja učinkovitosti i sigurnosti ozonske terapije u liječenju zubnog karijesa. Pretražili su randomizirana kontrolirana ispitivanja u osam baza podataka od početka godine do travnja 2020. (MEDLINE, EMBASE, CENTRAL, LILACS, Bibliografia Brasileira de Odontologia, ClinicalTrials.gov, WHO i OpenGrey) prema primarnim ishodima (antimikrobni učinak i nuspojave). Korišten je Cochrane alat rizika od pristranosti za procjenu metodološke kvalitete uključenih ispitivanja, GRADE pristup za procjenu sigurnosti dokaza te softver Review Manager za provođenje metaanaliza. U 12 ispitivanja, koja uspoređuju ozonsku terapiju bez ozona, klorheksidin-diglukonat, sredstva za brtvljenje fisura (sama i dodana ozonu) i fluorid, a s obzirom na primarne ishode, utvrđeno je da terapija ozonom pokazuje: (a) manje smanjenje broja bakterija u odnosu na klorheksidin-diglukonat u djece, dok u odraslih nije primijećena razlika; (b) veće smanjenje broja bakterija u odnosu na brtvilo, ali nije primijećena razlika nakon završne ekskavitacije. Što se tiče sigurnosti terapije ozonom, rezultati pojedinačnih studija nisu pokazali nikakve nuspojave tijekom ili nakon terapije. Većina je ovih rezultata neprecizna i treba ih tumačiti s oprezom zbog kliničkih i metodoloških problema, male veličine uzorka i širokog intervala pouzdanosti, što onemogućuje određivanje stvarnog smjera učinka. Autori su zaključili da broj znanstvenih dokaza nije dovoljan da bi se terapija ozonom preporučila

la za liječenje zubnog karijesa. Međutim, ukazuju na potrebu znanstvenih istraživanja koja bi se odnosila na dugoročne antimikrobne učinke terapije ozonom slijedeći preporuke izjave CONSORT za izvješćivanje o istraživanjima.

### Uloga ozona u oralnoj medicini i parodontologiji

Brojna su istraživanja provedena s ciljem ispitivanja antimikrobnih svojstava ozona i njegove sposobnosti u dopunskom liječenju raznih oralnih stanja, parodontne bolesti i oralne kandidijaze. Ozon djeluje antimikrobno u usnoj šupljini na način da ometa funkciju staničnih stijenki mikroorganizama i njihove metaboličke procese. Stoga se može koristiti u liječenju infekcija uzrokovanih parodontnim patogenima i vrstama bakterije *Candida*. Poznato je da ove infekcije imaju značajnu ulogu u bolesti parodonta i u oralnom sooru<sup>151-153</sup>. Nekoliko je znanstvenih radova izvijestilo o pozitivnim rezultatima pri korištenju terapije ozonom u kombinaciji s uobičajenim dentalnim terapijskim postupcima, pa terapija ozonom može učinkovito smanjiti infekciju bakterijama i gljivicama te dovesti do poboljšanih kliničkih ishoda kod pacijenata s parodontnim infekcijama i oralnom kandidijazom<sup>154-156</sup>.

Bolesti gingive i parodonta predstavljaju velik problem u području dentalne medicine. Budući da posjeduje antimikrobna i regenerativna svojstva tkiva, koristan je u svim stadijima bolesti gingive i parodonta. Deepthi i Bilichodmath<sup>157</sup> objavili su metaanalizu o učincima ozona kao dodatka mehaničkoj terapiji kod pacijenata s parodontitisom. Pretraživanje literature o terapiji ozonom kod parodontitisa provedeno je za razdoblje od 1. siječnja 2010. do 30. srpnja 2018. pretragom mjerodavnih članaka u bazama PubMed, Medline, Embase, Cochrane i Google Scholar. Strategija pretraživanja koristila je i predmetne naslove stomatologije i termine slobodnog teksta. Rezultat metaanalize na odgovarajućih šest istraživanja od ukupno 123 bio je da se terapija ozonom može učinkovito koristiti kao dodatak uklanjanju kamenca i blanjanju korijena u liječenju parodontitisa.

Lokalna primjena ozona, kao antimikrobnog sredstva za nekirurško liječenje parodontne bolesti, dobar je alat potpore parodontnoj terapiji.

## ZAKLJUČAK

Terapija ozonom pokazala je dobar potencijal kao alternativna ili komplementarna opcija u liječenju raznih bolesti. Problem primjene terapije ozonom je nepostojanje standardiziranih protokola. Standardizacijom protokola ozonoterapije postigla bi se ujednačenost postupaka liječenja, doziranja i načina primjene te, što je najvažnije, sigurnost i učinkovitost terapije, kao i usporedivost s drugim istraživanjima. Standardizirani postupci također će omogućiti istraživačima bolju procjenu dokaza, a kliničarima pouzdaniju primjenu dostupnih postupaka temeljenih na dokazima i donošenje odluke o korištenju protokola. Iako klinička istraživanja još nisu u potpunosti opravdala ovaj potencijal u stomatologiji, dobro osmišljena klinička ispitivanja s dovoljnom veličinom uzorka, dugim razdobljima praćenja i standardiziranim postupcima trebala bi omogućiti potencijalnu upotrebu ozona kao terapijske opcije u stomatologiji.

**Izjava o sukobu interesa:** Autori izjavljuju kako ne postoji sukob interesa.

## LITERATURA

1. Bocci V. Ozone: A new medical drug. 2<sup>nd</sup> Edition. Dordrecht: Springer, 2011;1-315.
2. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Arch Med Res 2006;37:425-35.
3. Fahey DW, Hegglin MI. Twenty Questions and Answers About the Ozone Layer. Scientific Assessment of Ozone Depletion. World Meteorological Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
4. Pietsch GJ, Gibalov VI. Dielectric barrier discharges and ozone synthesis. Pure Appl Chem 1998;70:1169-74.
5. Wei L, Lin W, Liao W, Zhang Y, Chen Y, Yuan P. Current pulses and their influences on ozone production in oxygen-fed dielectric barrier discharge. J Electrostat 2022;119:304-24.
6. Ozone Solutions [Internet]. San Antonio: How an ozone generator works, c2024 [cited 2024 Jan 30]. Available from: <https://ozonesolutions.com/>.
7. Oxidation Technologies [Internet]. Inwood: Ozone production, c2017 [cited 2024 Jan 30]. Available from: <https://www.oxidationtech.com/>.
8. Ono R, Nakagawa Y, Tokumitsu Y, Matsumoto H, Oda T. Effect of humidity on the production of ozone and other radicals by low-pressure mercury lamps. J Photochem Photobiol A Chem 2014;274:13-19.
9. Martinelli M, Giovannangeli F, Rotunno S, Trombetta CM, Montomoli E. Water and air ozone treatment as an alternative sanitizing technology. J Prev Med Hyg 2017; 58:48-52.

10. Mohamad GM. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radic Biol Med* 1990;9:245-65.
11. Apte MG, Buchanan IS, Mendell MJ. Outdoor ozone and building-related symptoms in the BASE Study. *Indoor Air* 2008;18:156-70.
12. Kruza M, Lewis AC, Morrison GC, Carslaw N. Impact of surface ozone interactions on indoor air chemistry : A modeling study. *Indoor Air* 2017;27:1001-11.
13. Liu Y, Misztal PK, Arata C, Weschler CJ, Nazaroff WW, Goldstein AH. Observing ozone chemistry in an occupied residence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021;9:118-26.
14. Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. *Free Radic Biol Med* 1994;17:451-65.
15. Zhang YQ, Wu QP, Zhang JM, Yang XH. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol* 2011;111:1006-15.
16. Shields RL, Gold WM. Effect of inhaled ozone on lung histamine in conscious guinea pigs. *Environ Res* 1987;42:435-45.
17. Last JA, Ward R, Temple L, Kenyon NJ. Ovalbumin-Induced Airway Inflammation and Fibrosis in Mice Also Exposed to Ozone. *Inhal Toxicol* 2004;16:33-43.
18. Hansen JS, Nørgaard AW, Koponen IK, Sørli JB, Paidi MD, Hansen SWK et al. Ozone-Initiated Reaction Products Attenuate Allergic Lung Inflammation in Mice. *J Immunotoxicol* 2016;13:793-803.
19. Michaudel C, Fauconnier L, Julé Y, Ryffel B. Functional and Morphological Differences of the Lung upon Acute and Chronic Ozone Exposure in Mice. *Sci Rep* 2018;8:10611-20.
20. Sokolowska M, Quesniaux VFJ, Akdis CA, Chung KF, Ryffel B, Togbe D. Acute Respiratory Barrier Disruption by Ozone Exposure in Mice. *Front Immunol* 2019;13:29-38.
21. Li F, Xu M, Wang M, Wang L, Wang H, Zhang H et al. Roles of Mitochondrial ROS and NLRP3 Inflammasome in Multiple Ozone-Induced Lung Inflammation and Emphysema. *Respir Res* 2018;19:230-43.
22. Michaudel C, Bataille F, Maillat I, Fauconnier L, Colas C, Sokol H et al. Ozone-Induced Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Controls Lung Inflammation via Interleukin-22 Modulation. *Front Immunol* 2020;11:33-42.
23. Liu Y, Pan J, Zhang H, Shi C, Li G, Peng Z et al. Short-Term Exposure to Ambient Air Pollution and Asthma Mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 2019;200:24-32.
24. Balmes JR. The role of ozone exposure in the epidemiology of asthma. *Environ Health Perspect* 1993;4:219-24.
25. Devlin RB, Raub JA, Folinsbee LJ. Health effects of ozone. *Sci Med* 1997;5:8-17.
26. Kim BG, Lee PH, Lee SH, Park CS, Jang AS. Impact of Ozone on Claudins and Tight Junctions in the Lungs. *Environ Toxicol* 2018;33:798-806.
27. Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EMG, Doorn JA et al. Nitrate and Oxidative Stress in Toxicology and Disease. *Toxicol Sci* 2009;112:4-16.
28. Michaudel C, Couturier-Maillard A, Chenuet P, Maillat I, Mura C, Couillin I et al. Inflammasome, IL-1 and Inflammation in Ozone-Induced Lung Injury. *Am J Clin Exp Immunol* 2016;5:33-40.
29. Michaudel C, Maillat I, Fauconnier L, Quesniaux V, Chung KF, Wiegman C et al. Interleukin-1 $\alpha$  Mediates Ozone-Induced Myeloid Differentiation Factor-88-Dependent Epithelial Tissue Injury and Inflammation. *Front Immunol* 2018;9:15-25.
30. Xu M, Wang L, Wang M, Wang H, Zhang H, Chen Y et al. Mitochondrial ROS and NLRP3 Inflammasome in Acute Ozone-Induced Murine Model of Airway Inflammation and Bronchial Hyperresponsiveness. *Free Radic Res* 2019;53:780-90.
31. Che L, Jin Y, Zhang C, Lai T, Zhou H, Xia L et al. Ozone-Induced IL-17A and Neutrophilic Airway Inflammation Is Orchestrated by the Caspase-1-IL-1 Cascade. *Sci Rep* 2016;6:186-97.
32. Enweasor C, Flayer CH, Haczk A. Ozone-Induced Oxidative Stress, Neutrophilic Airway Inflammation, and Glucocorticoid Resistance in Asthma. *Front Immunol* 2021;26:12-25.
33. Bromberg PA. Mechanisms of the Acute Effects of Inhaled Ozone in Humans. *Biochim Biophys Acta* 2016;1860:2771-2781.
34. Arjomandi M, Balmes JR, Frampton MW, Bromberg P, Rich DQ, Stark P et al. Respiratory Responses to Ozone Exposure. MOSES (The Multicenter Ozone Study in Older Subjects). *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:1319-27.
35. Bennett WD, Ivins S, Alexis NE, Wu J, Bromberg PA, Brar SS et al. Effect of Obesity on Acute Ozone-Induced Changes in Airway Function, Reactivity, and Inflammation in Adult Females. *PLoS ONE* 2016;11:160-78.
36. Koman PD, Mancuso P. Ozone Exposure, Cardiopulmonary Health, and Obesity: A Substantive Review. *Chem Res Toxicol* 2017;30:1384-95.
37. Shore SA. Mechanistic Basis for Obesity-Related Increases in Ozone-Induced Airway Hyperresponsiveness in Mice. *Ann Ats* 2017;14:357-362.
38. Mathews JA, Krishnamoorthy N, Kasahara DI, Hutchinson J, Cho Y, Brand JD et al. Augmented Responses to Ozone in Obese Mice Require IL-17A and Gastrin-Releasing Peptide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2017;58:341-51.
39. Birukova A, Cyphert-Daly J, Cumming RI, Yu YR, Gowdy KM, Que LG et al. Sex Modifies Acute Ozone-Mediated Airway Physiologic Responses. *Toxicol Sci* 2019;169:499-510.
40. Cho Y, Abu-Ali G, Tashiro H, Brown TA, Osgood RS, Kasahara DI et al. Sex Differences in Pulmonary Responses to Ozone in Mice. Role of the Microbiome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2019;60:198-208.
41. Kasahara DI, Shore SA. IL-33, diet-induced obesity, and pulmonary responses to ozone. *Respir Res* 2020;21:98-108.
42. Rowen RJ. Ozone therapy as a primary and sole treatment for acute bacterial infection: case report. *Med Gas Res* 2018;8:121-24.
43. Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 2006;37:425-35.
44. Fitzpatrick E, Holland OJ, Vanderlelie JJ. Ozone therapy for the treatment of chronic wounds: A systematic review. *Int Wound J* 2018;15:633-44.
45. Andrade RR, Oliveira-Neto OB, Barbosa LT, Santos IO, Sousa-Rodrigues CF, Barbosa FT. Effectiveness of ozone therapy compared to other therapies for low back pain: a systematic review with meta-analysis of randomized clinical trials. *Braz J Anesthesiol* 2019;69:493-501.

46. Sconza C, Respizzi S, Virelli L, Vandenbulcke F, Iacono F, Kon E et al. Oxygen-Ozone Therapy for the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Arthroscopy* 2020;36:277-86.
47. Sconza C, Leonardi G, Kon E, Respizzi S, Massazza G, Marcacci M et al. Oxygen-ozone therapy for the treatment of low back pain: a systematic review of randomized controlled trials. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2021;25:6034-46.
48. Tirelli U, Cirrito C, Pavanello M, Piasentin C, Lleshi A, Taibi R. Ozone therapy in 65 patients with fibromyalgia: an effective therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019;23:1786-88.
49. Toy S, Tuncer K, Topal M, Aydın A. Corticosteroid, Platelet-Rich Plasma, and Ozone Injections for Sinus Tarsi Syndrome. *J Am Podiatr Med Assoc* 2023;113:220-28.
50. Setyo Budi D, Fahmi Rofananda I, Reza Pratama N, Sutanto H, Sukma Hariftyani A, Ratna Desita S et al. Ozone as an adjuvant therapy for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol* 2022;110:109-14.
51. Raeissadat SA, Ghazi Hosseini P, Bahrami MH, Salman Roghani R, Fathi M, Gharooee Ahangar A et al. The comparison effects of intra-articular injection of Platelet Rich Plasma (PRP), Plasma Rich in Growth Factor (PRGF), Hyaluronic Acid (HA), and ozone in knee osteoarthritis; a one year randomized clinical trial. *BMC Musculoskelet Disord* 2021;22:134-44.
52. Elawamy A, Hassanien M, Talaat EA, Ali AM, Roushdy ASI, Kamel EZ. Intra-Carpal Injection of Ozone versus Methylprednisolone in Carpal Tunnel Syndrome of Systemic Sclerosis Patients: A Randomized Single-Blind Clinical Trial. *Pain Physician* 2021;24:453-58.
53. Ercalik T, Kilic M. Efficacy of Intradiscal Ozone Therapy with or without Perforaminal Steroid Injection on Lumbar Disc Herniation: A Double-Blinded Controlled Study. *Pain Physician* 2020;23:477-84.
54. Cagini C, Mariniello M, Messina M, Muzi A, Balducci C, Moretti A et al. A. The role of ozonized oil and a combination of tobramycin/dexamethasone eye drops in the treatment of viral conjunctivitis: a randomized clinical trial. *Int Ophthalmol* 2020;40:3209-215.
55. Franzini M, Valdenassi L, Ionita G. First evaluations of oxygen-ozone therapy in antibiotic-resistant infections. *Ozone Therapy* 2016;1:5-7.
56. Braidy N, Izadi M, Sureda A, Jonaidi-Jafari N, Banki A, Nabavi SF et al. Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: Focus on diabetes and spinal pain. *J Cell Physiol* 2018;233:2705-714.
57. Remondino M, Valdenassi L. Different Uses of Ozone: Environmental and Corporate Sustainability. Literature Review and Case Study. *Sustainability* 2018;4:9-18.
58. Bocci V. Autohaemotherapy after Treatment of Blood with Ozone. *J Int Med Res* 1994;22:131-44.
59. El Meligy OA, Elemam NM, Talaat IM. Ozone Therapy in Medicine and Dentistry: A Review of the Literature. *Dent J* 2023;11:187-99.
60. Shah MA, Anande LK, Powar A, Captain J, Mk Nair P. The Role of Medical Ozone in Improving Antioxidant Status in Multiple Drug-Resistant Tuberculosis Patients: A Quasi-experimental Study. *Middle East J Rehabil Health Stud* 2019;6:67-77.
61. Hernández A, Viñals M, Isidoro T, Vilás F. Potential role of oxygen-ozone therapy in treatment of COVID-19 pneumonia. *Am J Case Rep* 2020;21:1-6.
62. Himuro H. The Effect of Ozone on Colonic Epithelial Cells. *Kurume Med J* 2018;4:75-81.
63. Li LY, Ma RL, Du L, Wu AS. Ozonated autohemotherapy modulates the serum levels of inflammatory cytokines in gouty patients. *Rheumatol* 2017;9:159-65.
64. Catrina SB, Zheng X. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. *Diabetologia* 2021;64:709-16.
65. Fu Q, Colgan SP, Shelley CS. Hypoxia: The Force that Drives Chronic Kidney Disease. *Clin Med Res* 2016;14:15-39.
66. Marsch E, Sluimer JC, Daemen MJ. Hypoxia in atherosclerosis and inflammation. *Curr Opin Lipidol* 2013;24:393-400.
67. Shi R, Liao C, Zhang Q. Hypoxia-Driven Effects in Cancer: Characterization, Mechanisms, and Therapeutic Implications. *Cells* 2021;10:678.
68. Suzuki T, Shinjo S, Arai T, Kanai M, Goda N. Hypoxia and fatty liver. *World J Gastroenterol* 2014;20:15087-97.
69. Wang B, Li ZL, Zhang YL, Wen Y, Gao YM, Liu BC. Hypoxia and chronic kidney disease. *EBioMedicine* 2022;77:103-23.
70. Zhang X, Huang C, Li X, Shangguan Z, Wei W, Liu S et al. HFD and HFD-provoked hepatic hypoxia act as reciprocal causation for NAFLD via HIF-independent signaling. *BMC Gastroenterol* 2020;20:366-73.
71. Bosco MC, Puppo M, Blengio F, Fraone T, Cappello P, Giovarelli M et al. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* 2008;213:733-49.
72. Murdoch C, Muthana M, Lewis CE. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J Immunol* 2005;175:6257-63.
73. Safronova O, Pluemsampant S, Nakahama K, Morita I. Regulation of chemokine gene expression by hypoxia via cooperative activation of NF-kappaB and histone deacetylase. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:2270-80.
74. Chen J, Chen J, Fu H, Li Y, Wang L, Luo S, Lu H. Hypoxia exacerbates nonalcoholic fatty liver disease via the HIF-2 $\alpha$ /PPAR $\alpha$  pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019;317:710-22.
75. Hara Y, Watanabe N. Changes in expression of genes related to glucose metabolism in liver and skeletal muscle of rats exposed to acute hypoxia. *Heliyon* 2020;6:34-46.
76. Mooli RGR, Rodriguez J, Takahashi S, Solanki S, Gonzalez FJ, Ramakrishnan SK et al. Hypoxia via ERK Signaling Inhibits Hepatic PPAR $\alpha$  to Promote Fatty Liver. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2021;12:585-97.
77. Onyango AN. Endogenous ozone as a regular reactive oxygen species in ( patho ) physiology *Advances in Redox Research Endogenous ozone as a regular reactive oxygen species in (patho) physiology. Adv Redox Res [Internet]. 2023;9. [cited 2024 Jan 12]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.arres.2023.100075>.*
78. Dos Santos LMC, da Silva ES, Oliveira FO, Rodrigues L de AP, Neves PRF, Meira CS et al. Ozonized water in microbial control: Analysis of the stability, *in vitro* biocidal potential, and cytotoxicity. *Biology (Basel)* 2021;10:43-9.
79. Hernández A, Viñals M, Isidoro T, Vilás F. Potential role of oxygen-ozone therapy in treatment of COVID-19 pneumonia. *Am J Case Rep* 2020;21:1-6.

80. Bonetti M, Fontana A, Martinelli F, Andreola C. Oxygen-ozone therapy for degenerative spine disease in the elderly: a prospective study. *Acta Neurochir Suppl* 2011; 108:137-42.
81. Baeza-Noci J, Pinto-Bonilla R. Systemic Review: Ozone: A Potential New Chemotherapy. *Int J Mol Sci* 2021;22: 117-123.
82. Boczkowska-Radziwon B, Olbromski PJ, Rogowska A, Bujno M, Myśliwiec M, Żebrowska A et al. Ozonation of Whole Blood Results in an Increased Release of Micro-particles from Blood Cells. *Biomolecules* 2022;12: 164-175.
83. Janssen-Heininger YMW, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T et al. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1-17.
84. Surabhi S, Jachmann LH, Shumba P, Burchhardt G, Hammerschmidt S, Siemens N. Hydrogen peroxide is crucial for NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 $\beta$  production and cell death in pneumococcal infections of bronchial epithelial cells. *J Innate Immun* 2021;6:1-15.
85. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med* 2011;9:66-76.
86. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Ozone: A new therapeutic agent in vascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011;11:73-82.
87. Hudson J, Sharma M, Vimalanathan S. Development of a Practical Method for Using Ozone Gas as a Virus Decontaminating Agent. *Ozone-Sci Eng* 2009;31:216-223.
88. Murray BK, Ohmine S, Tomer DP, Jensen KJ, Johnson FB, Kirsir JJ et al. Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *J Virol Methods* 2008;153:74-7.
89. Ataei-Pirkooh A, Alavi A, Kianirad M, Bagherzadeh K, Ghasempour A, Pourdakan O. Destruction mechanisms of ozone over SARS-CoV-2. *Sci Rep* 2021;11:188-95.
90. Chirumbolo S, Valdenassi L, Simonetti V, Bertossi D, Ricevuti G, Franzini M et al. Insights on the mechanisms of action of ozone in the medical therapy against COVID-19. *Int Immunopharmacol* 2021;96:107-15.
91. Fernández-Cuadros ME, Albaladejo-Florín MJ, Peña-Lora D, Álava-Rabasa S, Pérez-Moro OS. Ozone (O $_3$ ) and SARS-CoV-2: Physiological Bases and Their Therapeutic Possibilities According to COVID-19 Evolutionary Stage. *SN Compr Clin Med* 2020;2:1094-102.
92. Rowen RJ, Robins H. A Plausible "Penny" Costing Effective Treatment for Corona Virus – Ozone Therapy. *J Infect Dis Epidemiol* 2020;6:113-120.
93. Martinez-Sanchez G. Mechanisms of action of O $_3$ . *Genomic pathways. Ozone Ther Glob J* 2019;9:21-2.
94. Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, Hernández-Matos Y, Barrios JM, Martínez-Sánchez G. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and proinflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Rev Esp Ozonoterapia* 2018;8:48-9.
95. Martinez-Sanchez G, Delgado-Roche L. Up-date on the mechanisms of action of ozone through the modification of cellular signaling pathways. Role of Nrf2 and NFkB. *Rev Esp Ozonoterapia* 2017;7:17-8.
96. Cenci A, Macchia I, La Sorsa V, Sbarigia C, Di Donna V, Pietraforte D. Mechanisms of Action of Ozone Therapy in Emerging Viral Diseases: Immunomodulatory Effects and Therapeutic Advantages With Reference to SARS-CoV-2. *Front Microbiol* 2022;13:19-29.
97. Franzini M, Valdenassi L, Ricevuti G, Chirumbolo S, Depfenhart M, Bertossi D et al. Oxygen-ozone (O $_2$ -O $_3$ ) immunocutaneous therapy for patients with COVID-19. Preliminary evidence reported. *Int Immunopharmacol* 2020;88:14-16.
98. Kapıcıbaşı HO, Kiraz HA, Demir ET, Adali Y, Elmas S. Pulmonary effects of ozone therapy at different doses combined with antibioticotherapy in experimental sepsis model. *Acta Cir Bras* 2020;35:20-28.
99. Tüfekçi H, Güven BB, Biçerer E, Dere K, Özkan S, Dağlı G. Effects of Different Ozone Doses Added to the Antibiotic Treatment on Cytokine Levels in Experimental Sepsis Model. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Derg* 2023;10:98-103.
100. Kushmakov R, Gandhi J, Seyam O, Jiang W, Joshi G, Smith NL et al. Ozone therapy for diabetic foot. *Med Gas Res* 2018;8:111-115.
101. Astasio-Picado Á, Babiano AÁ, López-Sánchez M, Lozano RR, Cobos-Moreno P, Gómez-Martín B. Use of Ozone Therapy in Diabetic Foot Ulcers. *J Pers Med* 2023;13:14-39.
102. Faraji N, Goli R, Choobianzali B, Bahrami S, Sadeghian A, Sepehrnia N et al. Ozone therapy as an alternative method for the treatment of diabetic foot ulcer: a case report. *J Med Case Rep* 2021;15:234-42.
103. Wen Q, Chen Q. An Overview of Ozone Therapy for Treating Foot Ulcers in Patients With Diabetes. *Am J Med Sci* 2020;360:112-119.
104. Clavo B, Santana-Rodríguez N, Llontop P, Gutiérrez D, Suárez G, López L et al. Ozone Therapy as Adjuvant for Cancer Treatment: Is Further Research Warranted? *Evid Based Complement Alternat Med* 2018;18:79-91.
105. Yanchu L, Rong P, Rong C, Li Z, Xiaoyan Y, Feng W. Ozone therapy for high-grade glioma: an overview. *Front Oncol* 2023;13:116-129.
106. Hwang SY, Chae JI, Kwak AW, Lee MH, Shim JH. Alternative Options for Skin Cancer Therapy via Regulation of AKT and Related Signaling Pathways. *Int J Mol Sci* 2020;21:68-79.
107. Clavo B, Santana-Rodríguez N, Llontop P, Gutierrez D, Ceballos D, Méndez C et al. Ozone Therapy in the Management of Persistent Radiation-Induced Rectal Bleeding in Prostate Cancer Patients. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;5:48-55.
108. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012;8:1719-29.
109. Lucia A, Guzman E. Emulsions containing essential oils, their components or volatile semiochemicals as promising tools for insect pest and pathogen management. *Adv Colloid Interf Sci* 2021;87:111-22.
110. Ozyildiz F, Karagonlu S, Basal G, Uzel A, Bayraktar O. Micro-encapsulation of ozonated red pepper seed oil with antimicrobial activity and application to nonwoven fabric. *Lett Appl Microbiol* 2013;56:168-79.
111. Roth A, Elkashif A, Selyamani V. Wearable and flexible ozone generating system for treatment of infected dermal wounds. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:458-69.
112. Valacchi G, Fortino V, Bocci V. The dual action of ozone on the skin. *Br J Dermatol* 2005;153:1096-100.
113. Fernández J, Del Valle Fernández I, Villar CJ, Lombó F. Combined laser and ozone therapy for onychomycosis in an in vitro and ex vivo model. *PLoS One* 2021;16:57-69.

114. Zeng J, Dou J, Gao L, Xiang Y, Huang J, Ding S et al. Topical ozone therapy restores microbiome diversity in atopic dermatitis. *Int Immunopharmacol* 2020;80:106-31.
115. Zeng J, Lei L, Zeng Q, Yao Y, Wu Y, Li Q et al. Ozone Therapy Attenuates NF- $\kappa$ B-Mediated Local Inflammatory Response and Activation of Th17 Cells in Treatment for Psoriasis. *Int J Biol Sci* 2020;16:1833-45.
116. Wang X. Emerging roles of ozone in skin diseases. *Br J Dermatol* 2018;43:114-23.
117. Machado AU, Contri RV. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy for Dermatological Disorders: A Literature Review of Clinical Trials. *Indian J Dermatol* 2022;67:479-91.
118. Patel PV, Kumar V, Kumar S, Gd V, Patel A. Therapeutic effect of topical ozonated oil on the epithelial healing of palatal wound sites: a planimetric and cytological study. *J Investig Clin Dent* 2011;2:248-58.
119. Valacchi G, Sticozzi C, Zanardi I. Ozone mediators effect on "in vitro" scratch wound closure. *Free Radic Res* 2016;50:1022-31.
120. Borrelli E. Transcutaneous ozone therapy: an underestimated medical practice. *Int J Complement Altern Med* 2021;14:126-9.
121. Roobab U, Madni GM, Ranjha MMAN, Khan AW, Selim S, Almuhayawi MS et al. Applications of water activated by ozone, electrolysis, or gas plasma for microbial decontamination of raw and processed meat. *Front Sustain Food Syst* 2023;7:1-14.
122. Tiwari S, Avinash A, Katiyar S, Aarthi Iyer A, Jain S. Dental applications of ozone therapy: A review of literature. *Saudi J Dent Res* [Internet]. 2017;8. [cited 2024 Jan 15]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjdr.2016.06.005>.
123. Song M, Zeng Q, Xiang Y. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol Med Rep* 2018;17:2449-55.
124. Ouf SA, Moussa TA, Abd-Elmegeed AM, Eltahlawy SR. Anti-fungal potential of ozone against some dermatophytes. *Braz J Microbiol* 2016;47:697-702.
125. Di Paolo N, Bocci V, Cappelletti F, Petrini G, Gaggiotti E. Necrotizing fasciitis successfully treated with extracorporeal blood oxygenation and ozonation (EBOO). *Int J Artif Organs* 2002;25:1194-98.
126. Travagli V, Zanardi I, Silviotti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol* 2007;41: 504-11.
127. Isler SC, Uraz A, Guler B, Ozdemir Y, Cula S, Cetiner D. Effects of Laser Photobiomodulation and Ozone Therapy on Palatal Epithelial Wound Healing and Patient Morbidity. *Photomed Laser Surg* 2018;36:571-80.
128. Al-Omiri MK, Lamfon HA, Al Nazeh AA, Kielbassa AM, Lynch E. Randomized clinical trial on the comparison of bleaching outcomes using either ozone or hydrogen peroxide. *Quintessence Int* 2018;49:625-34.
129. Durmus N, Tok YT, Kaya S, Akcay M. Effectiveness of the ozone application in two-visit indirect pulp therapy of permanent molars with deep carious lesion: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig* 2019;23: 3789-99.
130. Uraz A, Karaduman B, Isler SÇ, Gönen S, Çetiner D. Ozone application as adjunctive therapy in chronic periodontitis: Clinical, microbiological and biochemical aspects. *J Dent Sci* 2019;14:27-37.
131. Matys J, Jaszczak E, Flieger R, Kostrzewska-Kaminiarz K, Grzech-Leśniak K, Dominiak M. Effect of ozone and diode laser (635 nm) in reducing orthodontic pain in the maxillary arch-a randomized clinical controlled trial. *Lasers Med Sci* 2020;35:487-96.
132. Grocholewicz K, Matkowska-Cichocka G, Makowiecki P, Drożdżik A, Ey-Chmielewska H, Dziewulska A et al. Effect of nano-hydroxyapatite and ozone on approximal initial caries: a randomized clinical trial. *Sci Rep* 2020;10:111-23.
133. Al-Omiri MK, Alqahtani NM, Alahmari NM, Hassan RA, Al Nazeh AA, Lynch E. Treatment of symptomatic, deep, almost cariously exposed lesions using ozone. *Sci Rep* 2021;11:154-63.
134. Krunić J, Stojanović N, Đukić L, Roganović J, Popović B, Simić I et al. Clinical antibacterial effectiveness and biocompatibility of gaseous ozone after incomplete caries removal. *Clin Oral Investig* 2019;23:785-92.
135. Uslu MÖ, Akgül S. Evaluation of the effects of photobiomodulation therapy and ozone applications after gingivectomy and gingivoplasty on postoperative pain and patients' oral health-related quality of life. *Lasers Med Sci* 2020;35:1637-47.
136. Sen S, Sen S. Ozone therapy a new vista in dentistry: integrated review. *Med Gas Res* 2020;10:189-92.
137. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life* 2012;5:59-67.
138. Burke FJ. Ozone and caries: a review of the literature. *Dent Update* 2012;39:271-78.
139. Almaz ME, Sönmez İŞ. Ozonska terapija u liječenju i prevenciji karijesa. *J Formos Med Assoc* 2015;114:3-11.
140. Unal M, Oztas N. Remineralization Capacity of Three Fissure Sealants with and without Gaseous Ozone on Non-Cavitated Incipient Pit and Fissure Caries. *J Clin Pediatr Dent* 2015;39:364-70.
141. Safwat O, Elkateb M, Dowidar K, Salam HA, El Meligy O. Microbiological Evaluation of Ozone on Dentinal Lesions in Young Permanent Molars using the Stepwise Excavation. *J Clin Pediatr Dent* 2018;42:11-20.
142. Badhe HK, Balasubramanian S, Kamki H, Kalaskar A. Antimikrobni učinak terapije ozonom u dubokoj dentalnoj karijesnoj leziji: sustavni pregled. *Int J Clin Pediatr Dent* 2022;15:252-60.
143. Kaptan F, Güven EP, Topcuoglu N, Yazici M, Külekçi G. In vitro assessment of the recurrent doses of topical gaseous ozone in the removal of *Enterococcus faecalis* biofilms in root canals. *Niger J Clin Pract* 2014;17:573-8.
144. Kuška-Kiełbratowska A, Wiench R, Mertas A, Bobela E, Kiełbratowski M, Lukomska-Szymanska M et al. Evaluation of the Sensitivity of Selected *Candida* Strains to Ozonated Water-An In Vitro Study. *Medicina (Kaunas)* 2022;58:1731-52.
145. Lena K, Marianne K. Ozone Treatment on Dentin Hypersensitivity Surfaces – A Pilot Study. *Open Dent J* 2017;11:65-70.
146. Talukdar A, Langthasa M, Talukdar P, Barman I. Ozone Therapy Boon to Dentistry and Medicine. *Int J Prev Clin Dent Res* 2015;2:59-66.
147. Floare AD, Focht D, Hajdu AI, Niculescu Talpoş IC, Bălean OI, Muntean CV et al. Ozone and microstructural morphological changes of tooth enamel. *Rom J Morphol Embryol* 2022;63:539-44.
148. Grocholewicz K, Matkowska-Cichocka G, Makowiecki P, Drożdżik A, Ey-Chmielewska H, Dziewulska A et al. Effect



- of nano-hydroxyapatite and ozone on approximal initial caries: a randomized clinical trial. *Sci Rep* 2020;10:11-19.
149. Meligy O, Almushayt A. One Year Follow up Study for Ozone and Fissure Sealant on Non-Cavitated Carious Lesions. *J King Abdulaziz Univ* 2013;3:79-101.
150. Santos GM, Pacheco RL, Bussadori SK, Santos EM, Riera R, de Oliveira Cruz Latorraca C et al. Effectiveness and Safety of Ozone Therapy in Dental Caries Treatment: Systematic Review and Meta-analysis. *J Evid Based Dent Pract* 2020;20:101-23.
151. Nicolini AC, Rotta IDS, Langa GPJ, Friedrich SA, Arroyo-Bonilla DA, Wagner MC et al. Efficacy of ozonated water mouthwash on early plaque formation and gingival inflammation: a randomized controlled crossover clinical trial. *Clin Oral Investig* 2021;25:1337-44.
152. Shichiri-Negoro Y, Tsutsumi-Arai C, Arai Y, Satomura K, Arakawa S, Wakabayashi N. Ozone ultrafine bubble water inhibits the early formation of *Candida albicans* biofilms. *PLoS One* 2021;16:116-29.
153. Tetè G, D'Amicantonio T, Polizzi E. Efficacy Ozone Therapy in Reducing Periodontal Disease. *Materials (Basel)* 2023;16:23-39.
154. Colombo M, Gallo S, Garofoli A, Poggio C, Arciola CR, Scribante A. Ozone Gel in Chronic Periodontal Disease: A Randomized Clinical Trial on the Anti-Inflammatory Effects of Ozone Application. *Biology* 2021;10:625-39.
155. Rapone B, Ferrara E, Santacroce L, Topi S, Gnoni A, Di-palma G et al. The Gaseous Ozone Therapy as a Promising Antiseptic Adjuvant of Periodontal Treatment: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Int J Environ Res Public Health* 2022;19:985-99.
156. Serafin G, De Biase A, Lamazza L, Mazzucchi G, Lollobrigida M. Efficacy of Topical Treatments for the Management of Symptomatic Oral Lichen Planus: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* 2023;20:1202-25.
157. Deepthi R, Bilichodmath S. Ozone Therapy in Periodontics: A Meta-analysis. *Contemp Clin Dent* 2020;11:108-15.