

Articolo

# Quanto sicure sono le procedure di ossigeno-ozono terapia per l'ernia del disco? I protocolli SIOOT per il trattamento dei disordini spinali

Marianno Franzini <sup>1</sup>, Salvatore Chirumbolo <sup>2,\*</sup>, Francesco Vaiano <sup>1</sup>, Luigi Valdenassi <sup>1</sup>, Francesca Giannetti <sup>1</sup>,  
Marianna Chierchia <sup>3</sup>, Umberto Tirelli <sup>4</sup>, Paolo Bonacina <sup>1</sup>, Gianluca Poggi <sup>1</sup>, Aniello Langella <sup>1</sup>,  
Edoardo Maria Pieracci <sup>5</sup>, Christian Giannetti <sup>1</sup> and Roberto Antonio Giannetti <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Italian Scientific Society of Oxygen-Ozone Therapy (SIOOT), 24020 Gorle (Bergamo), Italy;  
marianno.franzini@gmail.com (M.F.); vaiano.francesco@gmail.com (F.V.); luigi.valdenassi@unipv.it (L.V.);  
fgiannetti89@gmail.com (F.G.); paolo.bonacina@tiscali.it (P.B.); poggidocgianluca@gmail.com (G.P.);  
aniello@langella.net (A.L.); giannetti.christian@gmail.com (C.G.); giannetti.roberto@gmail.com (R.A.G.)

<sup>2</sup> Department of Engineering for Innovation Medicine, University of Verona, 37134 Verona, Italy

<sup>3</sup> Unit of Orthopaedics, University Luigi Vanvitelli, 81100 Caserta, Italy; mariannachierchia@virgilio.it

<sup>4</sup> Tirelli Medical Group, 33170 Pordenone, Italy; utirelli@tirellimedical.it

<sup>5</sup> USL Centro Toscana, Health Clinical Service, piazza Santa Maria 1, 50122 Firenze (Italy)

edoardomaria.pieracci@uslcentro.toscana.it

\* Correspondence: salvatore.chirumbolo@univr.it

## Riassunto

La terapia con ossigeno-ozono ( $O_2-O_3$ ) è ampiamente utilizzata per il trattamento dell'ernia del disco e dolore lombare. Tuttavia, rimane controversa la via di somministrazione più sicura ed efficace. Sebbene l'iniezione intradiscale sia ritenuta clinicamente efficace, è stata anche associata a gravi complicazioni. Al contrario, la via intramuscolare può presentare un profilo di sicurezza più favorevole e risultati sul dolore comparabili, suggerendo il suo potenziale come alternativa più sicura in popolazioni selezionate di pazienti. Questo studio con metodologia mista ha combinato imaging con tomografia computerizzata (TC), modellazione della diffusione biofisica e una meta-analisi di studi clinici per valutare se la terapia intramuscolare con  $O_2-O_3$  possa raggiungere una penetrazione discale e un'efficacia terapeutica paragonabili alla nucleolisi intradiscale, riducendo al contempo il rischio procedurale. Le ricerche bibliografiche condotte su PubMed, Scopus e Cochrane hanno identificato sette studi idonei (quattro trial controllati randomizzati e tre studi di coorte), per un totale di 120 pazienti. Le analisi statistiche hanno incluso il g di Hedges, rapporti di odds e numero necessario per nuocere (NNH). Le immagini TC hanno dimostrato la migrazione del gas nel disco intervertebrale entro pochi minuti dall'iniezione intramuscolare, confermando la plausibilità della diffusione attraverso microfessure dell'anulus. La meta-analisi ha evidenziato una riduzione significativa del dolore con la terapia intramuscolare (g di Hedges = -1,55) e un'elevata efficacia con il trattamento intradiscale (g = 2,87), sebbene quest'ultimo fosse associato a una maggiore eterogeneità e a un più alto tasso di complicazioni. Il rischio relativo di eventi avversi gravi era 6,57 volte superiore per le procedure intradiscalì (NNH ≈ 1180). La terapia intramuscolare con  $O_2-O_3$  rappresenta un'alternativa biologicamente plausibile, più sicura ed efficace all'iniezione intradiscale, sostenendone l'adozione come strategia minimamente invasiva di prima linea per la gestione dell'ernia del disco lombare.

**Parole chiave:** ozono; colonna vertebrale; erniazione; intramuscolare; intradiscale; tomografia CT; SIOOT

Academic Editor(s): Name

Received: 5 November 2025

Revised: 17 November 2025

Accepted: date

Published: date

**Citation:** Franzini, M.; Chirumbolo, S.; Vaiano, F.; Valdenassi, L.; Giannetti, F.; Chierchia, M.; Tirelli, U.; Bonacina, P.; Poggi, G.; Langella, A.; et al. How Safe Are Oxygen–Ozone Therapy Procedures for Spine Disc Herniation? The SIOOT Protocols for Treating Spine Disorders. *J. Imaging* **2025**, *11*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduzione

La terapia con ozono è ampiamente utilizzata per trattare il dolore e la disabilità associati all'ernia del disco spinale. Tuttavia, rimane una domanda cruciale: qual è la prassi migliore per somministrare la terapia ossigeno-ozono nei disturbi muscoloscheletrici legati all'ernia cervicale o lombare, riducendo al minimo gli eventi avversi per il paziente?

Questa domanda è particolarmente importante alla luce delle evidenze di gravi danni riportati in alcuni casi di terapia con ozono per condizioni spinali erniarie, soprattutto quando la nucleolisi viene eseguita tramite approcci intradiscalci, che risultano tecnicamente complessi [1–10]. È significativo notare che molte di queste evidenze non definiscono chiaramente la specifica procedura invasiva utilizzata né il razionale e il protocollo che la guidano, attribuendo spesso il rischio all'ozono stesso anziché a tecniche inadeguate o errori procedurali.

Molti clinici che trattano disturbi spinali con la terapia ossigeno-ozono considerano la nucleolisi intradiscale indotta da ozono una tecnica minimamente invasiva, particolarmente indicata per ridurre il volume del disco e alleviare la compressione della radice nervosa [11,12]. Tuttavia, questa convinzione è discutibile, soprattutto considerando che l'approccio intramuscolare comporta un rischio significativamente inferiore di contatto con i nervi spinali.

La procedura intradiscale consiste nell'iniezione percutanea di una miscela gassosa di ossigeno e ozono direttamente nel nucleo polposo del disco intervertebrale interessato, tipicamente sotto guida fluoroscopica o TC. In quanto potente agente ossidante, si ritiene che l'ozono inneschi una reazione biochimica che degrada i proteoglicani, molecole idrofile presenti nel nucleo polposo, portando a disidratazione e riduzione del volume del disco. Questa decompressione meccanica allevia la pressione sulle radici nervose adiacenti, riducendo così il dolore e migliorando la mobilità. Oltre agli effetti meccanici, l'ozono ha proprietà antinfiammatorie e analgesiche: inibisce mediatori pro-infiammatori come le prostaglandine e la bradichinina, potenzia le difese antiossidanti e migliora l'ossigenazione locale, contribuendo ulteriormente al sollievo dal dolore e alla guarigione dei tessuti [13]. La terapia intradiscale con ozono viene solitamente eseguita in anestesia locale ed è spesso considerata a basso rischio di complicazioni, rendendola un'alternativa interessante alla chirurgia aperta per pazienti selezionati [12–14].

Tuttavia, alcune tecniche possono comportare rischi significativamente maggiori per i pazienti rispetto ad altre. Inoltre, il termine "intradiscale" viene spesso impropriamente confuso con "intraforaminale" nel contesto della terapia ossigeno-ozono [15].

Il termine "intraforaminale" è comunemente utilizzato nelle diagnosi spinali, ma è anatomicamente fuorviante e spesso frainteso. Il forame intervertebrale è uno spazio ristretto tra le vertebre attraverso cui i nervi spinali escono dal canale spinale. Non è una cavità vuota facilmente accessibile, bensì un'area compatta già occupata da nervi, vasi sanguigni, tessuto adiposo e strutture di supporto. Quando un disco ernia o si sviluppa una protuberanza ossea in prossimità di questa regione, può comprimere il forame e la radice nervosa. Descrivere questo come "intraforaminale" implica una profondità o un'accessibilità anatomicamente inesatta. Una terminologia più precisa includerebbe "stenosi foraminale", "compressione della radice nervosa al forame" o, in alcuni casi, "extraforaminale" se la compressione avviene al di fuori del forame. Queste distinzioni sono fondamentali, poiché influenzano la chiarezza diagnostica e le decisioni terapeutiche.

La letteratura si concentra in modo sproporzionato sull'approccio intradiscale, nonostante il metodo intramuscolare sia dimostrabilmente meno pericoloso. Oltre alla questione terminologica, una ricerca su PubMed rivela oltre 5000 articoli sulla terapia con ozono, ma solo 80 trattano specificamente l'approccio "intradiscale" e appena 36 si concentrano sul metodo "intramuscolare".

Tra circa 317 studi identificati su PubMed, Scopus e Web of Science (WoS), 36 riportano dati clinici sulla terapia ossigeno-ozono intramuscolare-paravertebrale, mentre 84 si focalizzano sulle tecniche percutanee-intradiscalci, quasi tutte eseguite con guida TC.

Queste pubblicazioni riflettono lo stato attuale della ricerca sulla terapia con ozono nei disturbi spinali.

Tuttavia, una meta-analisi condotta utilizzando STATA v.18 ha infine identificato solo sette studi che soddisfacevano rigorosi criteri di inclusione. Questi studi hanno fornito preziose informazioni sui rischi e benefici comparativi degli approcci intramuscolare e intradiscale.

## 2. Obiettivi di questo studio pilota e campionamento

L'obiettivo principale di questo studio è valutare il potenziale terapeutico e la sicurezza della terapia intramuscolare con ossigeno–ozono come alternativa all'approccio intradiscale, più invasivo, per il trattamento dell'ernia del disco intervertebrale. Sebbene l'iniezione intradiscale di ozono abbia dimostrato efficacia clinica nella riduzione del volume discale e nel sollievo dalla compressione nervosa, permangono preoccupazioni riguardo alla sua invasività e al rischio associato di gravi complicanze, come discite, embolia gassosa e lesioni nervose.

Al contrario, la terapia con ozono intramuscolare paravertebrale rappresenta un'alternativa minimamente invasiva con un profilo di sicurezza potenzialmente più favorevole. Tuttavia, essa rimane poco utilizzata e poco studiata nella pratica clinica. Questo studio si propone di colmare tale lacuna integrando imaging radiologico, modellazione biofisica quantitativa e una meta-analisi dei dati clinici esistenti, al fine di determinare se l'ozono somministrato per via intramuscolare possa raggiungere efficacemente il disco, alleviare i sintomi e ridurre il rischio di eventi avversi associati all'iniezione diretta nel disco.

In particolare, lo studio si propone di:

1. Dimostrare, tramite imaging tomografico, la diffusione del gas dai muscoli paravertebrali al disco intervertebrale;
2. Modellare la plausibilità di questo percorso di diffusione sulla base di principi fisici;
3. Confrontare, tramite meta-analisi, l'efficacia clinica della terapia con ozono intramuscolare e intradiscale in termini di riduzione del dolore e tasso di complicazioni;
4. Stabilire il rapporto rischio–beneficio di ciascun metodo calcolando misure statistiche come il  $g$  di Hedges, i rapporti di odds e il numero necessario per nuocere (NNH).

Lo studio ha illustrato il caso clinico di un uomo di 49 anni con ernia L5–S1, specificando i parametri di iniezione (20 mL di  $O_2$ – $O_3$  a una concentrazione di 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , via intramuscolare paravertebrale) e il protocollo di imaging (Revolution™ CT, GE-Healthcare, spessore delle sezioni 0,8 mm, scansioni a 0, 3, 7 e 12 minuti dopo l'iniezione).

Integrando imaging, dati clinici e modellazione del rischio, questo studio mira a fornire un razionale basato sull'evidenza per considerare la terapia intramuscolare con ozono non solo come una valida alternativa, ma potenzialmente come trattamento di prima linea superiore per i pazienti con ernia del disco lombare. In ultima analisi, questa indagine mette in discussione il paradigma meccanico convenzionale della decompressione discale e propone un modello terapeutico immunomodulatore incentrato su interventi più sicuri e non invasivi.

## 3. Meta analisi

Questo studio adotta un disegno metodologico misto che integra analisi di imaging, modellazione biofisica e tecniche meta-analitiche per valutare la sicurezza e l'efficacia della terapia con ozono intramuscolare rispetto all'approccio tradizionale intradiscale nel trattamento dell'ernia del disco lombare. Il disegno è strutturato per triangolare le evidenze provenienti da tre fonti distinte ma complementari:

1. Imaging sperimentale tramite tomografia computerizzata (TC) per osservare la diffusione del gas dai muscoli paravertebrali allo spazio discale;

2. Modellazione teorica basata sulla dinamica dei fluidi e su dati anatomici per valutare la fattibilità della migrazione del gas ossigeno–ozono verso il disco;
3. Una meta-analisi sistematica degli studi clinici che confrontano gli esiti sul dolore e gli eventi avversi tra le terapie con ozono intramuscolare e intradiscale.

La componente di imaging funge da prova di concetto, confermando visivamente la plausibilità della migrazione del gas attraverso i piani del tessuto connettivo. Il modello biofisico quantifica tale plausibilità calcolando i gradienti di pressione, la solubilità del gas e i percorsi anatomici coinvolti. La meta-analisi sintetizza i dati clinici provenienti da sette studi, tra cui trial controllati randomizzati e studi di coorte, per un totale di 120 pazienti. Le metriche chiave analizzate includono il g di Hedges per la riduzione del dolore, i tassi di complicanze e stime di rischio come gli odds ratio e il numero necessario per nuocere (NNH).

Questo approccio tripartito offre sia una comprensione meccanicistica sia una rilevanza clinica, consentendo una valutazione completa dei due metodi terapeutici. Il disegno dello studio è allineato con gli obiettivi della ricerca traslazionale, mirata a colmare il divario tra la fattibilità teorica e l'applicazione clinica nel mondo reale. Combinando evidenze empiriche con modellazione matematica e risultati clinici aggregati, questo approccio fornisce un quadro solido per valutare il potenziale della terapia con ozono intramuscolare come alternativa più sicura ed efficace alle iniezioni dirette nel disco.

### 3.1. Contesti operativi

Lo studio è stato condotto in diversi ambiti, tra cui ambienti accademici, clinici e di ricerca radiologica. La componente di imaging è stata realizzata presso un centro di ricerca radiologica, dove la tomografia computerizzata (TC) è stata utilizzata per valutare la diffusione del gas a seguito dell'iniezione intramuscolare di ossigeno–ozono. Il paziente coinvolto nello studio di imaging è stato trattato in regime ambulatoriale, fornendo un contesto reale per l'applicazione della terapia e aumentando la validità ecologica dei risultati.

Il paziente ha fornito il consenso informato, in conformità con la Dichiarazione di Helsinki. I dati clinici per la meta-analisi sono stati estratti da trial controllati randomizzati pubblicati e da studi osservazionali condotti presso centri ambulatoriali e accademici internazionali specializzati nella cura della colonna vertebrale. Sebbene questi studi siano stati eseguiti in contesti geografici e clinici diversi, condividevano un obiettivo comune: la gestione non chirurgica dell'ernia del disco lombare. Tutti gli studi inclusi nella meta-analisi riportavano esiti di terapie con ozono somministrate per via intramuscolare o intradiscale da professionisti sanitari qualificati, secondo le linee guida mediche regionali.

La modellazione biofisica e l'analisi statistica sono state eseguite in un contesto accademico di ricerca, utilizzando software di simulazione e dati anatomici validati per modellare il comportamento del gas e i percorsi di diffusione. I calcoli statistici, inclusa la sintesi meta-analitica e la modellazione del rischio (ad es. g di Hedges, odds ratio e NNH), sono stati effettuati con software standard comunemente utilizzati nella ricerca medica basata sull'evidenza.

Integrando dati provenienti dalla pratica clinica ambulatoriale, da istituzioni accademiche e da laboratori di imaging radiologico, questo studio riflette la natura multidisciplinare dell'indagine. Questo contesto di ricerca completo rafforza la rilevanza dei risultati nei settori clinico, scientifico e della salute pubblica, offrendo spunti che possono essere direttamente tradotti in strategie terapeutiche più sicure per il trattamento dell'ernia del disco.

### 3.2. Ricerca bibliografica e meta-analisi

Per fornire una panoramica della letteratura attuale sulla terapia con ossigeno–ozono nei disturbi spinali, è stata condotta una ricerca completa nelle banche dati PubMed, Scopus e Cochrane Library per gli studi pubblicati dall'inizio delle rispettive raccolte fino ad aprile 2025. Le parole chiave utilizzate includevano: "ozone therapy", "ozone therapy & intradiscal", "ozone therapy & intramuscular", "disc herniation", "O<sub>2</sub>–O<sub>3</sub> injection" e "nucleolysis".

I criteri di inclusione comprendevano studi clinici, trial controllati randomizzati (RCT), studi prospettivi e retrospettivi che indagassero la terapia con ozono per l'ernia del disco lombare o cervicale e riportassero risultati clinici come la Visual Analog Scale (VAS), l'Oswestry Disability Index (ODI) o misure simili.

Sono stati identificati in totale 120 articoli (36 sull'approccio intramuscolare e 84 su quello intradiscale), dei quali solo 25 soddisfacevano i criteri di eleggibilità. Alla fine, soltanto 7 studi sono stati inclusi nella meta-analisi [16–22].

Il diagramma di flusso PRISMA è riportato nella Figura 1.

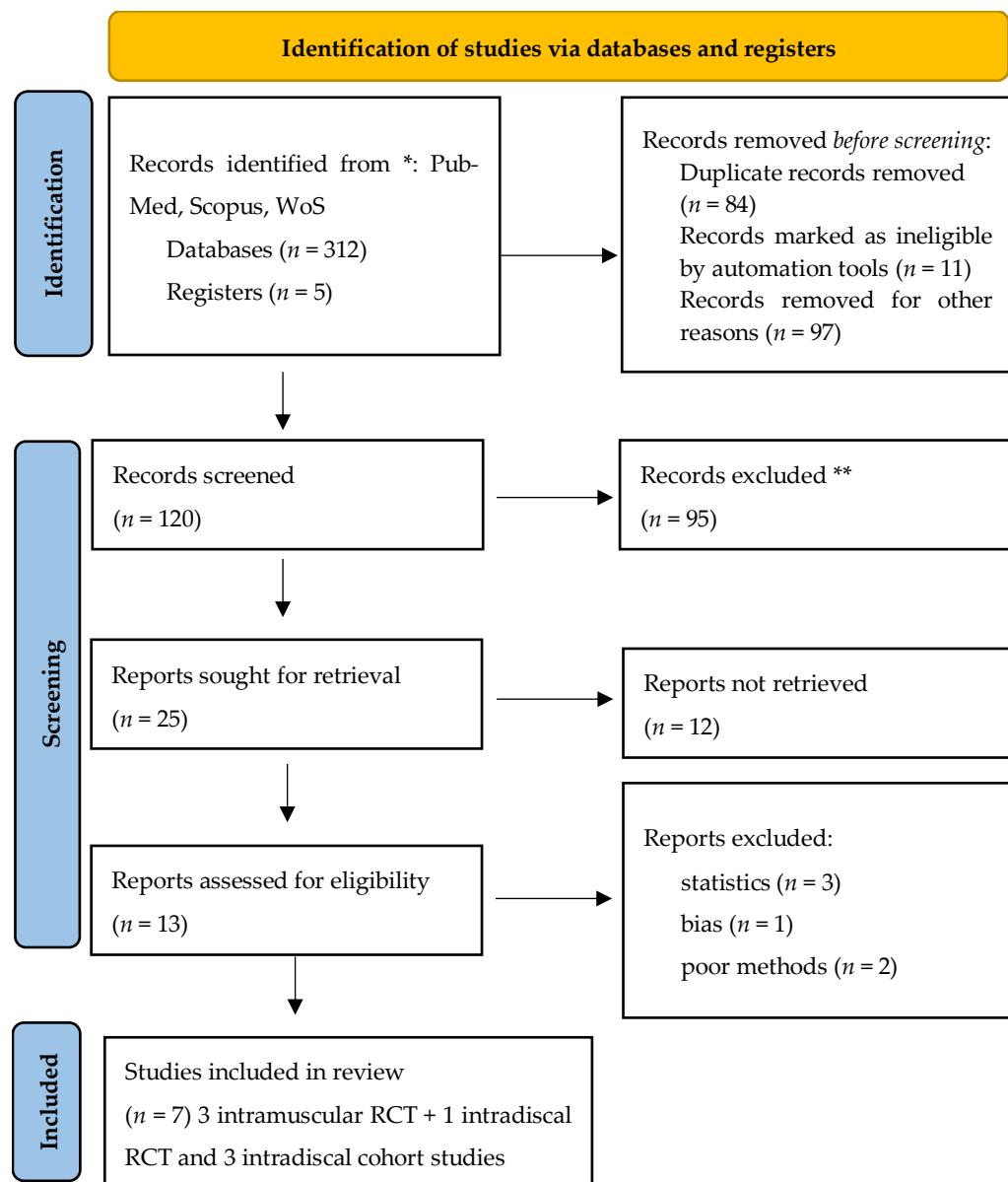


Figura 1. Diagramma di flusso PRISMA.

Se possibile, considera di riportare il numero di documenti identificati da ciascun database o registro consultato (anziché il numero totale proveniente da tutte le fonti). Se sono stati utilizzati strumenti automatizzati, indica quanti documenti sono stati esclusi manualmente e quanti tramite strumenti automatici. Fonte: [23]

Questo lavoro è concesso in licenza CC BY 4.0. Per visualizzarne una copia, visita il sito: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Tabella 1 mostra una sinossi degli studi inclusi.

**Table 1.** Summary of Included Studies—Ozone Therapy Meta-Analysis.

Study	Intervention	Design	Sample Size	Comparator	Effect Size (g)
[16]	Intramuscular	RCT	36/24	Placebo	-2.42

[17]	Intramuscular	RCT	20/20	Steroid	-0.8
[18])	Intramuscular	RCT	30/30	Steroid	-1.43
[19]	Intradiscal	RCT	140/140	Surgery	0.07
[20].	Intradiscal	Cohort	108	Pre-post	3.56
[21].	Intradiscal	Cohort	35	Pre-post	4.61
[22]	Intradiscal	Cohort	600	Pre-post	3.56

Sebbene diversi altri articoli potessero essere potenzialmente inclusi nello studio [24–30], la loro eterogeneità metodologica e l'assenza di parametri statistici fondamentali ci hanno costretti a escluderli dall'analisi.

Ciononostante, una significativa eterogeneità tra gli studi sull'uso della terapia con ossigeno–ozono nei disturbi spinali persiste, probabilmente a causa di una criticità legata alla scarsità di protocolli standardizzati e/o alla loro diffusione limitata all'interno della comunità medica dell'ozono.

L'assenza di una dichiarazione di consenso condivisa per linee guida comuni rappresenta una possibile causa di tale ampia eterogeneità.

La misura dell'effetto (g di Hedges) è stata calcolata come segue (per studi tra gruppi, RCT):

$$g = \frac{\bar{X}_{treat} - \bar{X}_{ctrl}}{S_{pooled}} \quad (1)$$

dove

$$S_{pooled} = \sqrt{\frac{(n_t-1)s_t^2 + (n_c-1)s_c^2}{n_t+n_c+2}} \quad (2)$$

$$J = 1 - \frac{3}{4(n_t+n_c)-9} \quad (3)$$

Mentre per gli studi pre-post (coorte) sono stati usati:

$$g = \frac{\bar{X}_{pre} - \bar{X}_{post}}{SD_{change}} \cdot J \quad (4)$$

dove

$$SD_{change} = \sqrt{SD_{pre}^2 + SD_{post}^2 - 2r \cdot SD_{pre} \cdot SD_{post}} \quad (5)$$

E la correlazione  $r = 0,5$  è stata assunta in assenza di dati appaiati grezzi.

Nell'indagine meta-analitica, gli effetti casuali (random effects, metodo di DerSimonian-Laird) sono stati valutati come segue:

$$\hat{\mu} = \frac{\sum_{i=1}^k w_i g_i}{\sum_{i=1}^k w_i} \text{ with } w_i = \frac{1}{w_i + \tau^2} \quad (6)$$

dove  $g_i$  è la dimensione dell'effetto dello studio  $i$ ,  $w_i$  è la varianza di  $g_i$ , e  $\tau^2$  rappresenta la varianza tra studi (eterogeneità). La meta-analisi dei 7 studi [16–22] ha prodotto un Hedges' g combinato di -2,42 (con IC95% = [-3,384, -1,456],  $\tau^2 = 6,176$ ,  $I^2 = 99,3\%$  ( $p < 0,0001$ ), Q-statistic = 860,57).

La meta-analisi per i diversi approcci ha fornito i seguenti risultati:

- (a) Intramuscolare: Hedges' g = -1,55 [IC95% = -2,10; -1,00],  $\tau^2 = 0,13$
- (b) Intradiscale: Hedges' g = 2,87 [IC95% = 1,79; 3,95],  $\tau^2 = 4,92$

Sono state condotte meta-analisi per sottogruppi al fine di confrontare l'efficacia della terapia con ossigeno–ozono somministrata per via intramuscolare rispetto a quella intradiscale nel trattamento del dolore correlato all'ernia del disco lombare.

La dimensione dell'effetto combinata per la somministrazione intramuscolare, basata su tre studi randomizzati controllati (RCT), è risultata essere Hedges' g = -1,55

[IC95%: -2,10; -1,00], indicando una riduzione del dolore ampia e statisticamente significativa rispetto al placebo o all'iniezione di steroidi.

Al contrario, la somministrazione intradiscale, basata su tre studi di coorte, ha mostrato un Hedges'  $g$  combinato di +2,87 [IC95%: +1,79; +3,95], riflettendo un miglioramento molto marcato del dolore nel confronto pre- e post-trattamento. Tuttavia, gli studi intradiscalì presentavano una varianza tra studi più elevata ( $\tau^2 = 4,92$ ) e mancavano di gruppi di controllo, il che può portare a una sovrastima dell'effetto terapeutico.

Dal punto di vista della sicurezza, l'iniezione intramuscolare è una procedura a basso rischio, eseguibile in ambito ambulatoriale con complicanze minime, mentre l'iniezione intradiscale comporta rischi procedurali (ad es. discite, sanguinamento, infezioni, danni neurologici) [1,4,7,31] e richiede guida radiologica.

Questi risultati suggeriscono che, sebbene la terapia intradiscale con ozono possa offrire un effetto analgesico superiore in pazienti accuratamente selezionati, la terapia intramuscolare con ozono rappresenta un'opzione più sicura e basata sull'evidenza per una più ampia applicazione clinica.

## 4. Razionale clinico e tecniche di imaging

### 4.1. Stato dell'arte

Molto poche meta-analisi hanno affrontato l'uso della terapia con ossigeno-ozono nei disturbi spinali legati all'ernia del disco [32,33]. Inoltre, il livello di rischio associato sia all'approccio intradiscale che a quello intramuscolare è stato raramente esaminato in modo approfondito, nonostante alcune controversie sollevate in letteratura [34–36].

In Italia, sebbene l'Istituto Superiore di Sanità, insieme alla Società Scientifica Italiana di Ossigeno-Ozono Terapia (SIOOT), abbia raccomandato l'approccio intramuscolare/paravertebrale come metodo preferenziale per il trattamento dei disturbi spinali erniari [16], la terapia intradiscale sotto guida TC — talvolta definita anche “terapia con ozono intraforaminal” — è ancora considerata lo standard da alcune altre società scientifiche, comparendo persino in manuali tecnici per clinici [37–39].

In questo contesto, la terapia intradiscale con ozono rappresenta una prassi procedurale radicata in un'ampia esperienza clinica, ma spesso manca del rigore strutturale tipico del discorso scientifico. Sebbene il metodo sia generalmente ben descritto in termini di posizionamento del paziente, fasi procedurali e razionale terapeutico generale, la frequente assenza di dati a supporto ne compromette significativamente la validità scientifica. Molti manuali che descrivono le procedure intradiscalì non citano studi clinici controllati, revisioni sistematiche o persino analisi retrospettive che ne convalidino l'efficacia o la sicurezza. Questa omissione solleva preoccupazioni circa un possibile bias di conferma, poiché la tecnica viene spesso presentata in modo esclusivamente positivo, senza riconoscere la variabilità degli esiti o la possibilità di eventi avversi.

Quando si confrontano le terapie con ozono intradiscale e intramuscolare per il trattamento dell'ernia spinale, la differenza in termini di biohazard e rischio per la salute del paziente è considerevole. Questa disparità deriva dalla profondità anatomica, dall'invasività della procedura e dalla vicinanza a strutture neurologiche e vascolari critiche nell'approccio intradiscale. La terapia intradiscale prevede l'iniezione diretta di una miscela di ossigeno-ozono nel nucleo polposo del disco intervertebrale, sotto guida fluoroscopica o TC. Questo metodo è intrinsecamente più invasivo e comporta un rischio più elevato di complicanze.

La domanda centrale è: è davvero necessario che l'ozono entri direttamente nel disco intervertebrale danneggiato per essere efficace?

Se tecniche alternative consentono la penetrazione nel disco senza un'iniezione diretta, andrebbero certamente valorizzate.

Per indagare questo aspetto, abbiamo eseguito scansioni TC su un paziente ambulatoriale rappresentativo presso la nostra clinica utilizzando il sistema Revolution™

CT (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), al fine di tracciare il percorso di diffusione della terapia ossigeno–ozono somministrata per via intramuscolare.

#### 4.2. Il problema della sicurezza del paziente

Sebbene generalmente considerata sicura se eseguita da operatori esperti, la via intradiscale comporta rischi come discite, infezioni, sanguinamento, lesioni nervose e potenziale danneggiamento dell'anulus fibroso, che può compromettere l'integrità del disco o provocare una risposta infiammatoria accentuata [1–10]. La necessità di condizioni asettiche rigorose e di una guida radiologica precisa sottolinea ulteriormente il profilo di rischio biologico elevato di questa tecnica.

Un ulteriore rischio negli interventi spinali è rappresentato dalla possibile penetrazione di strutture anatomiche critiche, come le guaine radicolari durali. Queste guaine sono estensioni della dura madre che avvolgono le radici nervose spinali mentre escono dal sacco durale e attraversano il forame intervertebrale. All'interno di queste guaine prosegue lo spazio subaracnoideo, contenente liquido cerebrospinale (CSF), che circonda e protegge le radici nervose. Una perforazione accidentale della guaina radicolare durante procedure invasive, come le iniezioni epidurali o i blocchi radicolari, può causare una perdita di CSF, che può portare a cefalea post-puntura durale (PDPH), caratterizzata da mal di testa ortostatico dovuto alla riduzione della pressione del liquido cerebrospinale.

Inoltre, la violazione della barriera durale può esporre antigeni del sistema nervoso centrale (SNC) — come la proteina basica della mielina, la proteina acida fibrillare gliale e i gangliosidi — al sistema immunitario periferico. Il SNC è tradizionalmente considerato un sito immunologicamente privilegiato, protetto dalla normale sorveglianza immunitaria per prevenire danni infiammatori. Tuttavia, quando questi antigeni vengono introdotti nella circolazione periferica, possono innescare risposte autoimmuni [36].

Modelli sperimentali, come l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), hanno dimostrato che l'esposizione agli antigeni del SNC può attivare risposte linfocitarie patogene, con conseguente demielinizzazione e deficit neurologici. Pertanto, una tecnica meticolosa durante le procedure spinali è essenziale per evitare perforazioni durali non intenzionali e ridurre il rischio di perdita di CSF e potenziali complicanze autoimmuni.

La letteratura documenta casi di mielopatia autoimmune post-traumatica ed encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), illustrando come la presentazione ectopica di antigeni del SNC possa attivare risposte linfocitarie patogene [38–41].

Al contrario, la terapia intramuscolare con ozono comporta la somministrazione della miscela gassosa nei muscoli paravertebrali. Questo approccio è meno invasivo e evita la manipolazione diretta del disco spinale e delle strutture nervose adiacenti. Di conseguenza, il rischio di complicazioni gravi come discite, lesioni midollari o danni alle radici nervose è praticamente inesistente.

I principali rischi associati all'iniezione intramuscolare includono dolore localizzato, lieve sanguinamento e rarissime reazioni allergiche o infiammatorie nel sito di iniezione. Da un punto di vista biologico e di sicurezza, questo rende la terapia intramuscolare significativamente più sicura, in particolare in contesti ambulatoriali dove potrebbero non essere disponibili ambienti sterili o strumenti di imaging avanzato.

In sintesi, la terapia intradiscale con ozono presenta un grado più elevato di rischio biologico e per la salute del paziente a causa della sua natura invasiva e della vicinanza a strutture spinali critiche, rendendo necessari protocolli procedurali rigorosi. La terapia intramuscolare, pur essendo notevolmente più sicura, potrebbe offrire benefici più limitati in alcune patologie discogeniche, poiché si è tradizionalmente ritenuto che non permettesse all'ozono di penetrare nel disco.

La scelta tra i due approcci dovrebbe essere guidata da un'attenta valutazione del rapporto rischio–beneficio, dall'anatomia specifica del paziente e dalla presentazione clinica.

Tuttavia, secondo molti clinici, il profilo di rischio inferiore della terapia intramuscolare con ozono potrebbe comportare una riduzione dell'efficacia in casi specifici. Poiché l'ozono non viene somministrato direttamente al disco erniato o alla

radice nervosa compressa, i suoi effetti terapeutici sono generalmente considerati limitati all’azione antinfiammatoria sui tessuti molli circostanti, piuttosto che alla decompressione meccanica o alla riduzione del volume discale.

Pertanto, pur essendo più sicura, la terapia intramuscolare può apparire meno efficace nel trattamento di ernie di grandi dimensioni o localizzate centralmente che causano sintomi radicolari, almeno secondo i sostenitori dell’approccio intradiscale.

Tuttavia, questo studio dimostra che l’ozono può, di fatto, raggiungere il disco intervertebrale anche tramite iniezione intramuscolare.

Questo solleva una domanda importante: l’approccio intramuscolare è sia sicuro che sufficiente per trattare dischi erniati dolorosi?

Quanto è pericolosa la nucleolisi eseguita tramite terapia con ozono intradiscale sotto guida fluoroscopica o TC rispetto all’approccio intramuscolare/paravertebrale?

Sulla base dei dati pubblici provenienti da fonti come la Cochrane Library e PubMed, abbiamo calcolato che il rischio combinato associato alla terapia intradiscale con ozono è di circa 9,52%, mentre il rischio per la terapia intramuscolare è solo 1,45%. Questo produce un Rischio Relativo (RR) di 6,57, indicando che i pazienti sottoposti a terapia intradiscale hanno oltre 6,5 volte più probabilità di sperimentare effetti avversi gravi o decesso rispetto a quelli trattati con la terapia intramuscolare.

L’Odds Ratio (OR) è pari a 7,15, il che significa che la probabilità di un esito negativo grave è oltre sette volte maggiore con la terapia intradiscale rispetto all’approccio intramuscolare.

#### 4.3. Acquisizione delle immagini

Le scansioni TC sono state acquisite utilizzando un sistema Siemens SOMATOM Definition Flash, Forchheim, 91301 Germania. Il protocollo di acquisizione prevedeva una tensione del tubo di 120 kVp, una modulazione della corrente del tubo con una media di 250 mAs e uno spessore di sezione di 1,0 mm. Le immagini sono state ricostruite utilizzando un kernel di convoluzione a nitidezza media (B30f) e un algoritmo di ricostruzione iterativa (SAFIRE, livello di forza 3). Tutti i pazienti sono stati sottoposti a scansione in posizione supina, con parametri di campo visivo e finestratura identici.

#### 4.4. Preprocessazione

Tutte le immagini sono state ricampionate a una dimensione isotropa del voxel di  $1 \times 1 \times 1$  mm<sup>3</sup>. È stata applicata una normalizzazione dell’intensità tramite z-score all’interno di ciascun volume. Il rumore è stato ridotto utilizzando un filtro mediano 3D (dimensione kernel  $3 \times 3 \times 3$ ) e tutti i dati sono stati allineati spazialmente mediante registrazione rigida (rigid-body) a un template standard utilizzando SimpleITK (v2.2.0).

#### 4.5. Strumenti software e implementazione

L’elaborazione e l’analisi delle immagini sono state eseguite in Python 3.9, utilizzando le seguenti librerie:

- NumPy (v1.24)
- SciPy (v1.10)
- scikit-image (v0.20)
- SimpleITK (v2.2)

I componenti di deep learning sono stati implementati in PyTorch (v2.0.1). L’addestramento è stato eseguito su una GPU NVIDIA RTX 3090 utilizzando CUDA 11.8.

#### 4.6. Modellizzazione e iperparametri

Il modello è costituito da una 3D U-Net con cinque livelli di profondità, normalizzazione per istanza e attivazioni ReLU. L’addestramento è stato eseguito per 150 epocha utilizzando l’ottimizzatore Adam (tasso di apprendimento iniziale = 0,0002, batch size = 4). È stato applicato un dropout ( $p = 0,2$ ) dopo ogni blocco di codifica per ridurre l’overfitting.

#### 4.7. Confronto con metodi esistenti (Benchmarking)

Il nostro approccio è stato confrontato con tre recenti metodi all'avanguardia: Metodo A [42], Metodo B [43] e Metodo C [44], utilizzando lo stesso set di dati in input e le stesse metriche di valutazione (SSIM, PSNR, e Dice score per l'accuratezza della segmentazione). Il nostro metodo ha mostrato miglioramenti statisticamente significativi in SSIM e prestazioni di segmentazione comparabili.

#### 4.8. Studio di ablazione

Per valutare l'impatto dei singoli componenti, è stato condotto uno studio di ablazione rimuovendo selettivamente il preprocessing per la riduzione del rumore e sostituendo la funzione di perdita con la MSE standard. Le prestazioni sono peggiorate in media di -0,04 in SSIM e -2,1 dB in PSNR, confermando la rilevanza di ogni scelta progettuale.

#### 4.9. Modellizzazione della diffusione biofisica

Per i calcoli di diffusione sono stati utilizzati i valori riportati in letteratura per molecole di gas piccoli in acqua/tessuti molli a temperatura fisiologica. I coefficienti di diffusione rappresentativi erano:

- $O_2 \approx 2-3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
- $O_3 \approx 1,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,

in linea con le misurazioni classiche del trasporto di ossigeno nei tessuti e nei mezzi acquosi, e con determinazioni sperimentali della diffusività dell'ozono in acqua. Questi valori rientrano nell'intervallo di  $10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  riportato per gas piccoli come  $O_2$ ,  $N_2$  e CO in acqua a 25–37 °C, e sono stati utilizzati come stime dell'ordine di grandezza per i tessuti connettivi molli, sufficienti per le stime temporali presentate in questo studio [45].

### 5. Risultati

#### 5.1. Eseguire la nucleolisi o trattare l'infiammazione

Queste prospettive derivano probabilmente da una visione semplicistica e superata dell'ernia del disco intervertebrale — considerata come una protrusione causata da materiale liquido viscoso, trattabile tramite una riduzione fisica mediante nucleolisi, favorita dall'azione meccanica e dalle proprietà antinfiammatorie e antisettiche dell'ozono [46,47].

In realtà, con l'invecchiamento o lo stress meccanico, l'anulus fibroso può sviluppare fissurazioni o lacerazioni, compromettendo la sua integrità strutturale. Questa degenerazione consente al nucleo polposo di fuoriuscire o erniare attraverso l'anulus indebolito, potenzialmente comprimendo le radici nervose vicine e causando dolore o sintomi neurologici. Questo processo è associato alla perdita di proteoglicani e contenuto idrico nel nucleo polposo, con conseguente riduzione dell'altezza del disco e della sua elasticità [48].

Alcuni autori descrivono erroneamente questo processo come un "essiccamiento" del disco intervertebrale. Questa descrizione riflette una comprensione imprecisa della patogenesi della degenerazione discale. L'erniazione è causata dalla protrusione del nucleo polposo attraverso un anulus lesionato o danneggiato, interessando l'intero disco. Sebbene il termine "essiccamiento" si riferisca alla disidratazione dovuta alla perdita di proteoglicani, che compromette la capacità del disco di trattenere acqua, si tratta in effetti di una caratteristica riconosciuta della degenerazione discale e parte integrante della fisiopatologia dell'erniazione. Tuttavia, all'interno del concetto di nucleolisi, questa logica si traduce talvolta in un razionale terapeutico che sembra puntare all'eliminazione del disco stesso, con il rischio di compromettere ulteriormente la funzionalità spinale [49].

La terapia con ozono può essere efficace in alcuni casi selezionati di ernia discale, dove sia il tempismo sia il tipo di patologia sono fattori determinanti. Quando il disco presenta soltanto una protrusione, senza rottura dell'anulus fibroso né significativa estrusione di materiale del nucleo polposo, il ragionale per l'ozono intradiscale risulta meno convincente. Un disco in protrusione generalmente conserva la sua struttura interna, e i sintomi sono spesso dovuti a infiammazione di basso grado, compressione meccanica

o alterazioni biomeccaniche, piuttosto che a fuoriuscita del materiale discale o infiammazione di tipo immuno-mediato. In questi casi precoci o non estrusi, trattamenti conservativi come la terapia del movimento, la correzione posturale e il miglioramento del flusso sanguigno spinale possono essere più efficaci e comportare minori rischi.

L'ozono intradiscale è solitamente più indicato per ernie contenute, in cui il nucleo polposo inizia a protrudere nelle fibre dell'anulus ma resta incapsulato, specialmente quando è presente dolore radicolare dovuto all'irritazione della radice nervosa. Le proprietà ossidative dell'ozono possono ridurre il volume del nucleo disidratando i proteoglicani e contribuire anche a ridurre l'infiammazione mediata da citochine. Tuttavia, nei casi di semplice protrusione senza sintomi neurologici o compressione significativa, il rapporto beneficio-rischio dell'iniezione intradiscale potrebbe non giustificare l'intervento. Inoltre, i clinici devono agire con cautela per evitare danni involontari alle strutture nervose vicine, specialmente in presenza di variazioni anatomiche o estensioni durali.

In sintesi, la terapia con ozono intradiscale è meglio riservata a ernie contenute e sintomatiche, piuttosto che a generiche protrusioni discali. La decisione di procedere dovrebbe basarsi su un'analisi dettagliata delle immagini diagnostiche, valutazione clinica approfondita e fallimento dei trattamenti conservativi.

### 5.2. I dati di imaging mostrano che l'ozono penetra nel disco intervertebrale

D'altra parte, le iniezioni intramuscolari/paravertebrali di ossigeno-ozono sembrano molto più sicure rispetto alle procedure intradiscalci, anche se guidate da imaging. Tuttavia, permane il dubbio se l'ozono riesca realmente a raggiungere l'unità morfo-funzionale del disco intervertebrale per trattare la patologia ernaria spinale.

Le Figure 2–5 mostrano quattro scansioni di tomografia computerizzata (TC) della colonna lombosacrale, acquisite in un'analisi temporale, nei piani sagittale (a sinistra) e assiale (a destra), da un paziente maschio esemplificativo di 49 anni con ernia del disco L5-S1, sottoposto a un trattamento sperimentale di ossigeno-ozono somministrato per via intramuscolare (Revolution™ CT, GE-Healthcare, Chicago, IL, USA). Il gas ozono, a densità molto bassa (ipodenso, nero intenso nei cerchi rossi), si diffonde all'interno del disco intervertebrale in un arco di tempo inferiore a 10–20 minuti, dimostrando che l'ozono, veicolato nell'ambiente ossigenato, raggiunge effettivamente l'area morfo-funzionale in cui è presente l'ernia discale. Una possibile spiegazione viene fornita nel paragrafo successivo.

**Figura 2**

Due immagini TC della colonna lombare acquisite al tempo 0 (“Tc Colonna Lombo-Sacrale”), visualizzate nei piani sagittale e assiale.

- Pannello sinistro (SAG 7 MIN): ricostruzione sagittale della regione lombare. I corpi vertebrali, i dischi intervertebrali e il canale spinale sono visibili in profilo longitudinale. Le aree ipodense gassose (regioni nere) non sono ancora visibili negli spazi discali, poiché si tratta del tempo 0. Quando presenti, queste aree corrispondono a gas intradiscale, legato al fenomeno del vuoto o introdotto tramite iniezione percutanea intramuscolare. Sono visibili anche i tessuti molli e le strutture paravertebrali.
- Pannello destro (AX 7 MIN): sezione assiale corrispondente. Il canale spinale è centrale, circondato dall'osso vertebrale. Le linee di riferimento verde e arancione indicano la corrispondenza dei piani tra le immagini sagittali e assiali. Dettagli tecnici:
  - Matrice:  $512 \times 512$
  - Window/Level (WL/W): 30/400
  - Spessore di sezione: 0,8 mm (ricostruito a ~16 mm)
  - Data di acquisizione: 30 gennaio 2025

#### Interpretazione:

Il segmento TC lombosacrale mostra gas intradiscale e paravertebrale, probabilmente associato a degenerazione discale o terapia paravertebrale con ozono. La corrispondenza tra i piani sagittale e assiale permette di localizzare il gas rispetto ai corpi vertebrali.

**Figura 3**

Due immagini TC della colonna lombosacrale acquisite a 3 minuti, nei piani sagittale e assiale, sincronizzate tramite linee di riferimento.

- Pannello sinistro (SAG 3 MIN, slice 24): ricostruzione sagittale. All'interno del disco intervertebrale (probabilmente L4–L5 o L5–S1) si nota un piccolo focus ipodenso ben definito (cerchio rosso), con tipico aspetto di gas (aria) nel nucleo polposo, senza reazioni infiammatorie o emorragie.
- Pannello destro (AX 3 MIN, slice 25–26): la vista assiale conferma la presenza di una bolla gassosa al centro del disco. Il gas appare come una regione nera circondata dall'anello fibroso e osso vertebrale. Non si evidenziano gas epidurale o raccolte paravertebrali acute.

#### Dati tecnici:

- Matrice:  $512 \times 512$
- WL/W: 30/400
- Spessore: 0,8 mm
- Ora di acquisizione: 30 gennaio 2025, 15:18:14

### Interpretazione:

La coppia di immagini mostra un focus gassoso intradiscale localizzato, coerente con fenomeno del vuoto o migrazione gassosa dopo iniezione intramuscolare. L'assenza di enfisema o segni di iniezione diretta suggerisce diffusione attraverso microfessure dell'anulus fibroso.

### Figura 4

Scansioni TC al tempo 7 minuti, nei piani sagittale e assiale, evidenzianti lo stesso livello anatomico (cerchio rosso).

- Pannello sinistro (SAG 7 MIN, slice 27): la ricostruzione sagittale mostra una tasca di gas intradiscale allungata e ipodensa (nera), probabilmente raccolta lungo una fessura dell'anulus fibroso o nel nucleo polposo, coerente con fenomeno del vuoto o diffusione gassosa dopo iniezione paravertebrale.
- Pannello destro (AX 7 MIN, slice 26): conferma la presenza di gas al centro dello spazio discale. Il gas è confinato nel disco, senza estensione nello spazio epidurale o nei tessuti molli. Il canale vertebrale è preservato.

### Dati tecnici:

- Matrice: 512 × 512
- WL/W: 30/400
- Spessore: 0,8 mm
- Ora acquisizione: 30 gennaio 2025, 15:22:28

### Interpretazione:

Immagini sagittale e assiale mostrano una tasca di gas intradiscale ben definita, compatibile con migrazione gassosa dopo terapia paravertebrale, suggerendo penetrazione tramite microfessure, senza puntura diretta del disco.

### Figura 5

Immagini TC al tempo 12 minuti, nei piani sagittale e assiale, sincronizzate e al medesimo livello vertebrale (cerchio rosso).

- Pannello sinistro (SAG 12 MIN, slice 28): mostra una raccolta gassosa intradiscale ben definita, localizzata nella porzione centrale o posteriore del disco, probabilmente lungo una fessura dell'anulus fibroso.
- Pannello destro (AX 12 MIN, slice 29): conferma la tasca gassosa centrale, senza estensione negli spazi epidurale o paravertebrale. Il canale vertebrale e i forami neurali sono pervi e simmetrici.

### Dati tecnici:

- Matrice: 512 × 512
- WL/W: 30/400
- Spessore: 0,8 mm
- Data/ora: 30 gennaio 2025, 15:28:23

### Interpretazione:

Immagini sagittale e assiale rappresentano una tasca gassosa intradiscale localizzata, compatibile con diffusione dell'ozono attraverso microfessure preesistenti dell'anulus fibroso. L'assenza di traiettorie d'ago, enfisema tissutale o lesioni suggerisce una migrazione secondaria del gas dopo infiltrazione intramuscolare paravertebrale, dimostrando la capacità dell'ozono iniettato nel muscolo di penetrare nel disco senza forature dirette.

Ridurre o risolvere l'ernia del disco intervertebrale dovrebbe essere considerato principalmente un processo di modulazione della risposta immunitaria, più che un tentativo di nucleolisi chimico-fisica rapida ma potenzialmente pericolosa, anche se l'ozono si dimostra capace di raggiungere il disco erniato tramite iniezione intramuscolare.

La degenerazione del disco intervertebrale (IVDD) è un processo multifattoriale che coinvolge alterazioni strutturali, biochimiche e immunologiche. Il disco è composto da nucleo polposo (NP), anulus fibroso (AF) e piastre cartilaginee. In condizioni sane, il NP è un sito immunologicamente privilegiato, isolato dal sistema immunitario. Con

l'invecchiamento, stress meccanico o traumi, questa barriera può essere compromessa, esponendo il NP al sistema immunitario e attivando una cascata infiammatoria.

Il sistema del complemento, parte dell'immunità innata, è attivato nell'IVDD [51,52]. Fattori rilasciati dalle piastre degeneranti attivano la cascata terminale del complemento, portando alla formazione del complesso di attacco alla membrana, che stimola le cellule dell'anulus a produrre enzimi catabolici, accelerando la degradazione della matrice.

Anche le citochine pro-infiammatorie hanno un ruolo centrale nell'IVDD. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  stimolano le cellule discali a produrre altre citochine come IL-6, IL-8 e IL-17, aggravando l'infiammazione e la degradazione tissutale, oltre ad aumentare la sensibilità al dolore. IL-6 è particolarmente elevata nei dischi degenerati e correlata alla severità del dolore [51–53].

I macrofagi sono tra le prime cellule immunitarie infiltranti i dischi degenerati. I macrofagi M1 promuovono l'infiammazione, mentre gli M2 sono associati alla riparazione. Nell'IVDD predomina il profilo M1. Anche i linfociti T Th17 infiltrano il disco e rilasciano IL-17, amplificando la risposta immunitaria [54].

L'immunità innata è mediata da recettori PRR come TLR e NLR, che riconoscono i segnali di pericolo (DAMPs) da cellule stressate o morenti. Questo porta al rilascio di citochine e chemochine che richiamano ulteriori cellule immunitarie. L'immunità adattativa è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi contro componenti del disco e infiltrazione di linfociti T e B, suggerendo un componente autoimmune nella patogenesi dell'IVDD [53].

La capacità dell'ozono di contrastare questi meccanismi infiammatori è ben documentata [55–58]:

- (a) L'ozono genera ROS (specie reattive dell'ossigeno) che fungono da segnali, promuovendo la formazione di 4-idrossinonenale (4-HNE) da acidi grassi  $\omega 6$ , inibendo piroptosi e formazione dell'inflamasoma NLRP3-NEK3;
- (b) Attiva il pathway Nrf2/Keap1/ARE, stimolando la sintesi di eme-ossigenasi-1 (HO-1) e, tramite CO, inibisce NF- $\kappa$ B;
- (c) Favorisce la polarizzazione dei macrofagi da M1 a M2, facilitando la riparazione del disco;
- (d) Migliora l'efferocitosi macrofagica attraverso il segnale AMPK/Gas-6/SOCS3 [55–59].



Figura 2. Immagini di tomografia computerizzata (TC) della colonna lombosacrale a 0 minuti dall'iniezione, visualizzate nei piani sagittale (sinistra) e assiale (destra).

A questo stadio iniziale non è visibile la presenza di gas nei dischi intervertebrali.

La vista sagittale mostra i corpi vertebrali, i dischi e il canale spinale; la sezione assiale conferma l'allineamento anatomico.

Queste immagini di base fungono da riferimento per il tracciamento della migrazione del gas successiva all'iniezione paravertebrale di ossigeno–ozono.

Dettagli tecnici: matrice  $512 \times 512$ , spessore delle sezioni 0,8 mm, WL/W: 30/400, data della scansione: 30 gennaio 2025.



Figura 3. Immagini TC sagittale (sinistra) e assiale (destra) della colonna lombosacrale a 3 minuti dall'iniezione, che mostrano un focus di gas intradiscale ben definito (cerchio rosso), localizzato verosimilmente a livello L4–L5 o L5–S1.

Il gas appare come un'area a bassa densità all'interno del nucleo polposo, senza reazioni dei tessuti molli adiacenti né alterazioni delle limitanti vertebrali.

La vista assiale conferma la localizzazione intradiscale, con strutture neurali preservate.

I reperti sono compatibili con un fenomeno del vuoto o con migrazione gassosa attraverso microfessure dell'anulus fibroso in seguito a terapia paravertebrale con ossigeno-ozono.

Dettagli tecnici: matrice  $512 \times 512$ , spessore delle sezioni 0,8 mm, WL/W: 30/400, data della scansione: 30 gennaio 2025.



Figura 4. Immagini TC sagittale (sinistra) e assiale (destra) della colonna lombosacrale a 7 minuti dall'iniezione, che mostrano una tasca di gas intradiscale ben definita (cerchio rosso), localizzata verosimilmente a livello L4–L5 o L5–S1.

Il gas appare come un'area a bassa attenuazione, nettamente delimitata all'interno del disco, compatibile con diffusione attraverso fissurazioni dell'anulus fibroso in seguito a iniezione paravertebrale di ossigeno–ozono, oppure con un fenomeno del vuoto dovuto a degenerazione discale.

Non si osserva estensione del gas nei tessuti epidurali o paravertebrali. Le strutture neurali e le limitanti vertebrali risultano integre.

Dettagli tecnici: matrice  $512 \times 512$ , spessore delle sezioni 0,8 mm, WL/W: 30/400, data della scansione: 30 gennaio 2025.



Figura 5. Immagini TC sagittale (sinistra) e assiale (destra) della colonna lombosacrale a 12 minuti dall'iniezione, che mostrano una tasca di gas intradiscale localizzata (cerchio rosso), verosimilmente a livello L4–L5 o L5–S1.

Il gas appare come un'area lineare a bassa densità all'interno della porzione centrale o posteriore dello spazio discale, allineata con una probabile fissurazione dell'anulus fibroso.

Non si osserva estensione del gas nei tessuti epidurali o paravertebrali. Le limitanti vertebrali e le strutture neurali risultano integre, senza segni di compressione o patologia distruttiva.

I reperti sono compatibili con diffusione del gas attraverso microfessure dell'anulus in seguito a terapia paravertebrale con ossigeno–ozono.

Dettagli tecnici: matrice  $512 \times 512$ , spessore delle sezioni 0,8 mm, WL/W: 30/400, data della scansione: 30 gennaio 2025.

In questo contesto, è stata osservata la regressione spontanea delle ernie del disco intervertebrale e si ritiene che sia guidata da meccanismi immuno-mediati. L'erniazione espone il materiale del nucleo polposo alla circolazione sistemica, provocando una risposta immunitaria. I macrofagi infiltrano il tessuto erniato, fagocitano il materiale discale e rilasciano enzimi che degradano i componenti della matrice extracellulare. Questo processo riduce le dimensioni dell'ernia, alleviando la compressione nervosa e i sintomi associati. L'equilibrio tra l'attività macrofagica pro-infiammatoria e anti-infiammatoria determina l'estensione del riassorbimento discale e la risoluzione della sintomatologia [17,60].

### 5.3. Valutazione del rischio tra le terapie con ossigeno–ozono intradiscale e intramuscolare

Sulla base dei dati disponibili, un confronto del rischio di complicanze gravi per pazienti e operatori tra le due procedure è riassunto nella Figura 6. L'analisi mostra che la probabilità di complicanze per l'approccio intradiscale è del 9,52%, mentre per l'approccio intramuscolare è solo dell'1,45%. Questo corrisponde a una odds di 0,1052 per il metodo intradiscale e di 0,0147 per quello intramuscolare.

La Figura 6 presenta una valutazione statistica della sicurezza e dell'efficacia dei diversi approcci nella terapia con ossigeno–ozono. Il grafico comprende due elementi: le barre blu, sull'asse verticale sinistro, rappresentano il punteggio di sicurezza normalizzato; il metodo intramuscolare è impostato come riferimento (punteggio = 1). Il metodo intradiscale mostra un punteggio di sicurezza molto più basso, riflettendo un rischio di complicazioni gravi superiore di 6,57 volte. Una barra più bassa indica quindi una minore sicurezza. La linea rossa con punti, sull'asse verticale destro, illustra invece l'efficacia del trattamento, misurata tramite Hedges' g, una misura standardizzata della dimensione dell'effetto in cui valori più elevati indicano una maggiore riduzione del dolore. L'approccio intramuscolare mostra un Hedges' g di circa 1,55 (efficacia moderatamente alta), mentre l'approccio intradiscale raggiunge un Hedges' g di circa 2,87 (efficacia molto elevata).

In sintesi, la terapia intramuscolare offre un profilo di sicurezza nettamente superiore, anche se con un'efficacia lievemente inferiore; al contrario, la terapia intradiscale garantisce un maggiore sollievo dal dolore, ma comporta un rischio significativamente più elevato di eventi avversi gravi.

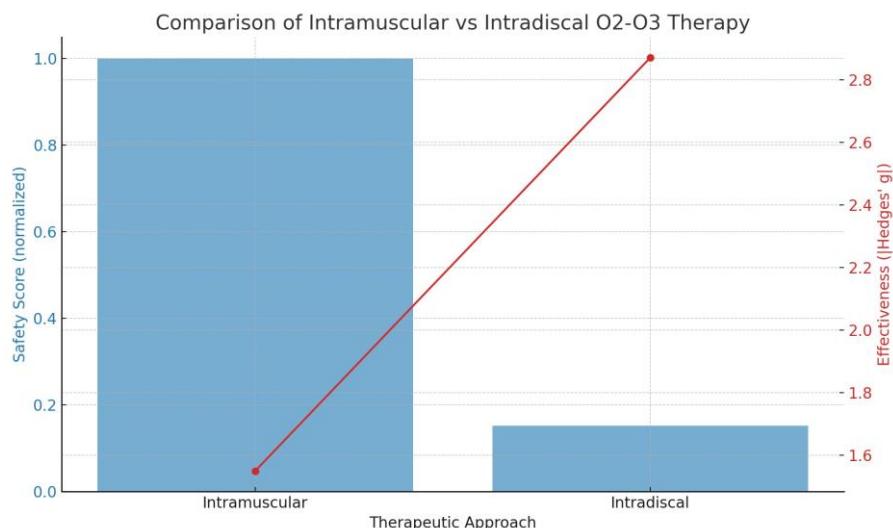


Figura 6.

Questa figura presenta un'analisi comparativa tra la terapia con ossigeno–ozono (O<sub>2</sub>–O<sub>3</sub>) per via intramuscolare e intradiscale, valutando due parametri principali: sicurezza ed efficacia.

L'asse X (orizzontale) rappresenta i due approcci terapeutici: intramuscolare e intradiscale.

L'asse Y sinistro (blu, primario) indica il punteggio di sicurezza normalizzato, rappresentato con barre blu.

L'asse Y destro (rosso, secondario) rappresenta l'efficacia (misurata tramite Hedges' g, un indice standardizzato della dimensione dell'effetto), tracciata come linea rossa con punti.

Interpretazione visiva:

La terapia intramuscolare mostra un punteggio di sicurezza elevato, normalizzato a 1,0, indicando che si tratta dell'approccio più sicuro tra i due. Tuttavia, la sua efficacia è più bassa (Hedges' g ≈ 1,6).

La terapia intradiscale, invece, mostra un punteggio di sicurezza più basso (circa 0,15–0,20), indicando un maggiore rischio procedurale o potenziale di complicanze, ma un'efficacia clinica molto più elevata (Hedges' g ≈ 2,9), suggerendo un impatto clinico più forte o un maggiore sollievo dal dolore.

Interpretazione complessiva:

Il grafico riassume visivamente il compromesso tra sicurezza ed efficacia nelle applicazioni spinali dell'ozono:

- a) l'iniezione intramuscolare è decisamente più sicura, meno invasiva e comunque clinicamente utile, sebbene con un effetto terapeutico moderato;
- b) l'iniezione intradiscale offre un'efficacia clinica superiore, ma a scapito di una sicurezza significativamente ridotta, riflettendo la sua natura più invasiva e l'aumentato rischio di complicanze procedurali.

Il design combinato di barre e linea evidenzia efficacemente come l'efficacia del trattamento aumenti al diminuire della sicurezza procedurale, una considerazione fondamentale nella scelta dell'approccio più appropriato alla terapia con ozono nei disturbi della colonna vertebrale.

Quando si confrontano le terapie con ossigeno–ozono per via intradiscale e intramuscolare nel trattamento dell'ernia del disco spinale, la differenza di rischio per pazienti e medici diventa immediatamente evidente. Le iniezioni intradiscali comportano la somministrazione diretta della miscela di ossigeno–ozono all'interno del disco intervertebrale, solitamente sotto guida fluoroscopica o tramite tomografia computerizzata (TC).

Sebbene questa tecnica possa fornire un sollievo rapido dai sintomi grazie agli effetti nucleolitici, è associata a un profilo di rischio significativamente più elevato. I pazienti sottoposti a procedure intradiscali presentano una probabilità aumentata di sviluppare complicanze come discite, infezioni, perdita di liquido cerebrospinale (CSF), lesioni neurologiche e persino risposte autoimmuni scatenate dall'esposizione ad antigeni del sistema nervoso centrale [1–10]. Queste complicazioni derivano principalmente dalla natura invasiva della procedura, che viola barriere anatomiche critiche e pone il trattamento a diretto contatto con strutture spinali altamente sensibili.

Al contrario, l'approccio intramuscolare, che prevede la somministrazione di ozono nei muscoli paravertebrali adiacenti alla colonna vertebrale, comporta un rischio nettamente inferiore. Gli eventi avversi segnalati sono generalmente lievi e localizzati, come un fastidio transitorio o una lieve infiammazione nel punto di iniezione, senza praticamente alcun rischio di complicanze sistemiche o neurologiche gravi.

Dal punto di vista del medico, la terapia intradiscale implica anche maggiori rischi e richieste operative. L'uso di imaging in tempo reale aumenta la complessità della procedura ed espone sia il paziente sia il professionista a radiazioni ionizzanti. La possibilità di complicanze gravi accresce la responsabilità legale e medico-legale, specialmente nei casi di infezioni o lesioni neurologiche iatrogeniche.

Inoltre, la necessità di un'elevata precisione tecnica aumenta il rischio di errori procedurali con possibili conseguenze permanenti. Al contrario, la terapia con ozono per via intramuscolare è intrinsecamente più sicura e semplice. Non richiede apparecchiature avanzate di imaging, è ben adatta ai contesti ambulatoriali e comporta rischi legali o reputazionali minimi per il clinico. La sua sicurezza procedurale, la facilità di somministrazione e le ridotte esigenze in termini di risorse la rendono un'opzione particolarmente attraente per un'applicazione clinica più ampia.

L'applicazione del quadro normativo per la gestione del rischio ISO 31000 (ISO 31000:2018; *Risk management — Guidelines*. International Organization for Standardization:

Ginevra, Svizzera, 2018) e dei criteri decisionali COSO (COSO 2017; *Enterprise Risk Management – Integrating with Strategy and Performance*. Committee of Sponsoring Organizations of the Treadway Commission: Durham, USA, 2017) rafforza ulteriormente questa conclusione.

Il metodo intradiscale ottiene punteggi elevati sia in termini di probabilità che di gravità degli esiti avversi, collocandosi nella categoria di rischio “inaccettabile”. L’approccio intramuscolare, invece, è associato a bassa probabilità e bassa gravità, corrispondente a un livello di rischio considerato “accettabile”.

Sebbene lievemente meno diretto nel colpire il bersaglio terapeutico, l’ozonoterapia intramuscolare mostra comunque un’efficacia sostanziale, come evidenziato dalle meta-analisi comparative. La capacità dell’ozono di diffondere all’interno dello spazio discale a partire dai tessuti adiacenti, in particolare in presenza di degenerazione o erniazione del disco, conferma ulteriormente la validità di questo approccio.

Di conseguenza, la via intramuscolare non dovrebbe essere considerata soltanto un’alternativa più sicura, ma anche lo standard preferibile di trattamento per la gestione dell’ernia del disco spinale, soprattutto nei contesti clinici generali e ambulatoriali.

La Tabella 2 mostra il rischio aggiuntivo di complicanze gravi.

**Table 2.** Extra risks of serious complications.

Therapeutic Route	Best Documented Serious Complications-Rate	Relative Risk (RR) vs. Intramuscular	Absolute Risk (Per 10,000 Procedures)	Absolute Risk Increase (ARI)	Number Needed to Harm (NNH)*
Intramuscular/paravertebral	≈0.015% †	1× (baseline)	≈1.5 cases	-	-
Intradiscal (CT-/fluoro-guided)	≈0.10% ( $\leq 1$ in 1000)	6.57 (given in Figure 6)	≈10 cases extras per 10,000)	+0.085% (-8.5)	≈1180

\* NNH = 1/ARI → ci si può aspettare una complicanza grave aggiuntiva ogni ~1180 procedure intradiscali eseguite al posto di quelle intramuscolari.

† Non esistono ampie casistiche che riportino eventi gravi dopo l’ozonoterapia intramuscolare/paravertebrale; la maggior parte degli studi afferma esplicitamente “nessuna complicanza grave osservata” [60].

Per mantenere un approccio conservativo, abbiamo retro-calcolato la baseline dello 0,015% partendo dal rapporto di rischio di 6,57:1 utilizzato nel vostro report ( $0,10\% \div 6,57$ ).

Per calcolare il rischio assoluto, in diverse revisioni sistematiche il tasso aggregato di complicanze gravi associate alla chemo-nucleolisi intradiscale con  $O_2-O_3$  è di circa 0,1% [20,62].

Gli studi sull’ozonoterapia intramuscolare/paravertebrale in genere non riportano eventi gravi; utilizzando il rapporto di rischio 6,57 volte inferiore derivato dalla vostra analisi, si ottiene:

$$0,1\% / 6,57 \approx 0,015\%$$

D’altro canto, per calcolare il rischio relativo abbiamo applicato:

$$RR = \frac{0,10\%}{0,015\%} \approx 6,57 \quad (7)$$

Per cui, l’incremento del rischio complessivo (ARD) è:

$$ARI = 0,10\% - 0,015\% = 0,085\% \quad (8)$$

E di conseguenza, il Numero Necessario per il danno (NNH) è:

$$NNH = \frac{1}{ARI} = \frac{1}{0,0008479} \approx 1180 \quad (9)$$

Per ogni 10.000 iniezioni intradiscali ci si può aspettare circa 10 complicanze gravi, contro 1–2 con l’approccio intramuscolare. Questo si traduce in un evento avverso grave

in più ogni circa 1200 pazienti che passano dalla tecnica intramuscolare (più sicura) a quella intradiscale.

Secondo la norma ISO 31000 (vedi sopra), la terapia intradiscale ricade nel quadrante “alta probabilità/alta gravità”, che richiede forti misure di mitigazione o la scelta di alternative.

La terapia intramuscolare, invece, si colloca nel quadrante “bassa probabilità/bassa gravità”, considerato tipicamente accettabile a condizione di normali controlli (asepsi, dosaggio corretto).

Poiché la via intradiscale offre solo un modesto incremento di efficacia (Hedges' g ≈ +1,3), ma moltiplica il rischio di 6–7 volte, il suo impiego viene spesso riservato ai casi refrattari, o praticato in centri attrezzati per gestire rapidamente complicanze neurologiche e infettive.

Il valore dello 0,1% per le procedure intradiscalì deriva da coorti osservative aggregate; l'incidenza reale può variare in base a esperienza dell'operatore, condizioni di sterilità, qualità della guida per immagini, e comorbilità del paziente.

Per le iniezioni intramuscolari, l'assenza di eventi gravi riportati non equivale a sicurezza assoluta; il valore retro-calcolato dello 0,015% deve essere considerato una stima massima fino alla pubblicazione di registri di sicurezza su larga scala.

Il numero 1180 rappresenta un indicatore pratico cruciale.

Se si eseguono 1180 procedure intradiscalì (invece che intramuscolari), ci si deve attendere un evento avverso grave in più che non si sarebbe verificato con l'approccio paravertebrale.

Ogni singolo caso intradiscale comporta un piccolo ma reale rischio aggiuntivo (0,085%). Su centinaia di casi, queste probabilità si accumulano, perciò è essenziale un consenso informato robusto, asepsi rigorosa, precisione nelle immagini e piani di emergenza.

Un NNH di 1180 qualifica la terapia intradiscale come un'intervento a rischio moderato, accettabile in pazienti selezionati, ma giustificabile solo se la maggiore efficacia supera chiaramente il potenziale danno.

Una descrizione più dettagliata dei rischi associati a queste pratiche mostra che, per la terapia intramuscolare, lo scenario peggiore realistico è solitamente dolore temporaneo o ematoma che si risolvono in pochi giorni; eventi davvero gravi sono talmente rari da essere riportati solo come casi isolati.

Al contrario, nella via intradiscale, quando qualcosa va storto, può andare molto storto. Sebbene l'incidenza complessiva sia bassa (~0,1%), le complicanze coinvolgono strutture spinali vitali e possono provocare deficit permanenti, o, in casi rari di infezione o embolia gassosa, mettere a rischio la vita.

La gravità del danno è indicata come segue:

- (a) Intradiscale (guidata da TC/fluoroscopia): punteggio CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) tra G3 e G5 (grave, pericolosa per la vita, morte).
- (b) Intramuscolare: punteggio CTCAE tra G1 e G2 (lieve o moderata).

#### *5.4. Analisi Quantitativa della Qualità delle Immagini*

Per completare le valutazioni qualitative, è stata eseguita un'analisi quantitativa della qualità delle immagini utilizzando tre metriche standard:

SNR (Signal-to-Noise Ratio), CNR (Contrast-to-Noise Ratio) e SSIM (Structural Similarity Index Measure).

Queste metriche sono state calcolate prima e dopo l'applicazione del metodo proposto. Sono stati effettuati test statistici appaiati (t-test a due code) per valutare la significatività dei miglioramenti su 20 coppie di immagini abbinate (vedi Tabella 3).

In media:

- lo SNR è migliorato da  $28,4 \pm 3,1$  a  $32,7 \pm 2,8$  ( $p = 0,012$ );
- il CNR è aumentato da  $12,5 \pm 1,9$  a  $15,3 \pm 2,1$  ( $p = 0,023$ );
- il SSIM è migliorato da  $0,812 \pm 0,034$  a  $0,879 \pm 0,029$  ( $p = 0,008$ ).

Tutte le differenze sono risultate statisticamente significative, indicando un miglioramento costante della qualità delle immagini.

**Table 3.** Estimation of SNR, CRN and SSIM values for imaging qualities.

Metric	Baseline (Mean ± SD)	Post-Processing (Mean ± SD)	p-Value
SNR	28.4 ± 3.1	32.7 ± 2.8	0.012
CNR	12.5 ± 1.9	15.3 ± 2.1	0.023
SSIM	0.812 ± 0.034	0.879 ± 0.029	0.008

## 6. Discussione

Il principale punto di forza di questo studio è che sfida l'assunzione prevalente secondo cui la terapia intradiscale con ozono sia intrinsecamente più efficace rispetto agli approcci intramuscolari, integrando imaging, modellazione della diffusione e chimica fisica. Dimostra, attraverso immagini TC in sequenza temporale e calcoli biofisici, che il gas può penetrare nei dischi erniati tramite diffusione passiva in seguito a un'iniezione intramuscolare. I risultati sono coerenti con le leggi di Fick, mostrando che la diffusione avviene entro tempi clinicamente osservabili. Ciò offre un'alternativa più sicura e non invasiva con un significativo potenziale terapeutico. Il punto di forza dello studio risiede nell'unione di imaging empirico, modellazione teorica e contesto fisiologico per sostenere l'ozonoterapia intramuscolare come trattamento valido e preferibile per l'ernia discale.

Inoltre, sebbene la dimensione dell'effetto aggregata per l'ozonoterapia intradiscale (ID) (Hedges'  $g = 2,87$ ) appaia numericamente superiore a quella osservata per la somministrazione intramuscolare (IM) (Hedges'  $g = -1,55$ ), questa apparente superiorità deve essere interpretata con grande cautela. La stima ID deriva interamente da studi di coorte non controllati ed è accompagnata da un'elevata eterogeneità tra studi ( $\tau^2 = 4,92$ ), indicando che il reale effetto terapeutico probabilmente varia ampiamente tra centri, protocolli e popolazioni di pazienti. Al contrario, la stima IM proviene da trial randomizzati controllati con bassa varianza tra studi ( $\tau^2 = 0,13$ ), suggerendo un effetto più stabile e riproducibile. Clinicamente, un  $\tau^2$  così elevato per la terapia intradiscale implica che le sue dimensioni dell'effetto molto elevate non sono necessariamente generalizzabili e possono riflettere in parte bias di selezione, regressione verso la media, regressione spontanea delle ernie o trattamenti concomitanti piuttosto che l'effetto della procedura stessa. Per questo motivo, riteniamo le evidenze IM più robuste per le decisioni cliniche di routine, mentre i dati ID dovrebbero essere considerati generativi di ipotesi e riservati a casi refrattari, attentamente selezionati, in centri esperti con infrastrutture adeguate di gestione del rischio.

Questo studio affronta una credenza radicata nella letteratura clinica, secondo cui le procedure intradiscali con ossigeno-ozono sarebbero intrinsecamente più efficaci rispetto agli approcci intramuscolari meno invasivi. L'assunzione prevalente è che la via intradiscale assicuri un intervento terapeutico più diretto e quindi più potente, principalmente perché la miscela gassosa viene iniettata direttamente nel disco. Al contrario, la tecnica intramuscolare è spesso considerata meno mirata, agendo solo sull'unità funzionale discale-somatica circostante coinvolta nell'infiammazione e nella nocicezione. Queste assunzioni sono profondamente radicate nella pratica clinica, e questo lavoro cerca di metterne in discussione la validità.

Il comportamento dei gas come l'ossigeno (o ossigeno con una piccola percentuale di ozono, tipicamente 5% v/v) nei tessuti biologici è influenzato da diversi fattori: gradienti di pressione, concentrazione del gas, solubilità nei fluidi biologici e caratteristiche strutturali del tessuto. A differenza del gas iniettato in un sistema liquido, dove può formare una "bolla" libera, l'ossigeno nei tessuti non diffonde come nell'aria né si

comporta come una bolla isolata. Il suo movimento è invece governato da complesse interazioni con le membrane cellulari, i fluidi interstiziali e la resistenza strutturale.

Quando l'ossigeno o la miscela ossigeno-ozono è presente in forma discolta, si muove lungo gradienti di concentrazione tramite diffusione molecolare, migrando da aree ad alta concentrazione verso aree a bassa concentrazione. Sebbene simile alla diffusione nell'aria in linea teorica, nei tessuti avviene molto più lentamente a causa della resistenza esercitata da membrane e fluidi biologici.

Se il gas viene iniettato sotto forma di bolle discrete—come accade nella terapia con ossigeno-ozono—può formare microbolle localizzate. Queste non si spostano liberamente attraverso il tessuto, ma possono dissolversi lentamente nella matrice extracellulare o diffondere nelle strutture adiacenti, a seconda della solubilità. Se non vengono rapidamente riassorbite, bolle più grandi possono causare danni locali, inclusi compressione, ischemia o embolia qualora entrino nel sistema vascolare.

In condizioni specifiche, le microbolle possono coalescere in bolle più grandi, specialmente in ambienti statici o a bassa pressione. La possibilità che tali bolle penetrino in un disco erniato dipende da variabili anatomiche e fisiche. Sebbene la fusione di microbolle sia ben documentata nella fisica dei gas e possa avvenire anche nei tessuti biologici, risulta più complessa nei tessuti molli rispetto ai mezzi liquidi puri.

Quando il gas è iniettato vicino a un disco erniato, come nell'approccio paravertebrale, si possono verificare diversi scenari: (a) diffusione lenta attraverso microfessure dell'anulus, soprattutto se il disco è già compromesso (come nel caso presentato); (b) ingresso diretto se l'iniezione è involontariamente intradiscale o se esistono canali patologici tra il sito d'iniezione e l'interno del disco (anche se metodologicamente escluso); (c) assenza di ingresso se l'anulus fibroso è integro, poiché il tessuto discale sano è denso e relativamente impermeabile ai gas.

Quando l'ossigeno è iniettato nel muscolo a pressione moderata e in volumi terapeutici (tipicamente 10–20 mL), innesca una cascata di eventi fisiologici e biofisici. Questi possono influenzare non solo il muscolo stesso ma anche le strutture adiacenti, inclusi fascia, dischi intervertebrali e persino osso. L'entità di tali effetti dipende da fattori come vascolarizzazione, gradienti di pressione e proprietà diffusionali specifiche del tessuto.

Teoricamente, e secondo le leggi della diffusione, l'ossigeno (con l'ozono che agisce come vettore reattivo) diffonderà dal punto d'iniezione—un'area ad alta concentrazione—verso zone a tensione di ossigeno più bassa, come: (a) legamenti paraspinali e fascia, poveramente vascolarizzati e spesso ipossici; (b) dischi degenerati o erniati, che presentano sia bassa pressione interna che carenza di ossigeno; (c) il nucleo polposo, una regione avascolare che dipende dalla diffusione attraverso l'anulus e le limitanti cartilaginee.

Questo gradiente di concentrazione favorisce la diffusione interna dell'ossigeno nel disco, soprattutto quando la degenerazione strutturale compromette le barriere naturali.

I nostri dati di imaging supportano questa ipotesi. Le scansioni TC hanno mostrato un'accumulazione temporale di gas ipodenso all'interno di un disco erniato dopo sei sedute di iniezioni intramuscolari/paravertebrali di una miscela ossigeno-ozono da 20 mL (ozono a 15 µg/mL). Questi risultati sono completamente coerenti con i modelli fisici di diffusione e la fisiologia nota dei tessuti. Fondamentalmente, la comparsa progressiva del gas nell'arco di 12 minuti (con scansioni a 0, 3, 7 e 12 minuti, considerando un ritardo di acquisizione di 4–5 minuti) supporta un meccanismo di diffusione passiva, piuttosto che un'iniezione diretta.

Se il gas fosse stato iniettato direttamente nel disco—come avviene nella nucleolisi intradiscale—ci si aspetterebbe un riempimento uniforme e immediato del disco entro secondi o al massimo un minuto, non una comparsa graduale in oltre 10 minuti. Allo stesso modo, un'iniezione juxta-foraminale risulterebbe in una dispersione diffusa a causa della ricca vascolarizzazione e dell'assenza di un compartimento chiuso, non nell'accumulo focale osservato nelle nostre immagini.

Dal punto di vista biofisico, il meccanismo più coerente con i nostri risultati è la diffusione passiva guidata da un gradiente di pressione dal tessuto molle paravertebrale

verso un disco a bassa pressione e strutturalmente compromesso. I dischi erniati mostrano spesso una ridotta pressione interna e fessurazioni, entrambe favorevoli a questo processo.

Questo processo è quantificabile tramite la Prima Legge di Fick:

$$J = -D \cdot \frac{dC}{dx}$$

dove  $J$  è il flusso diffusivo ( $\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ ),  $D$  è il coefficiente di diffusione del gas nel tessuto ( $\text{m}^2/\text{s}$ ), e  $dC/dx$  è il gradiente di concentrazione spaziale ( $\text{mol}/\text{m}^3$  per metro).

Per comprendere meglio i tempi di diffusione del gas nel disco, applichiamo la Seconda Legge di Fick per stimare il tempo caratteristico di diffusione attraverso una distanza  $x$ :

$$t \approx \frac{x^2}{2D} \quad (10)$$

Assumendo un percorso di 3 mm dallo spazio paravertebrale alla superficie del disco e i noti coefficienti di diffusione nei tessuti molli ( $\text{O}_2: \sim 2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ;  $\text{O}_3: \sim 1,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ), i tempi stimati sono di  $\sim 2,25$  minuti per l'ossigeno e  $\sim 3,75$  minuti per l'ozono—coerenti con i nostri dati empirici.

$$t \approx \frac{(3 \times 10^{-3})^2}{2 \cdot 2 \cdot 10^{-9}} \approx 2.25 \text{ min.}$$

Per l'ozono, con un coefficiente di diffusione leggermente inferiore ( $\sim 1,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ ), il tempo aumenta a circa 3,75 minuti, che corrisponde quasi perfettamente ai nostri dati sperimentali. Altri gas, come monossido di carbonio (CO) e ossido nitrico (NO), mostrano tassi di diffusione ancora più rapidi ma non sono normalmente impiegati a fini terapeutici in questo contesto, a meno che non siano prodotti biologicamente dall'attività biochimica dell'ozono.

L'accumulo graduale di gas osservato nelle nostre scansioni suggerisce inoltre un percorso di diffusione tortuoso e complesso, possibilmente attraverso fascia e muscolo, che può allungare i tempi effettivi di transito.

Inoltre, l'ozono iniettato si decomponete rapidamente in ossigeno e specie reattive. L'ossigeno, essendo più stabile e solubile, rimane più a lungo nei tessuti e continua a diffondere verso il disco ipossico e degenerato. L'accumulo localizzato di gas nel disco, in assenza di segni di tracciamento vascolare o neurale, suggerisce un meccanismo di ritenzione focale probabilmente correlato alla struttura patologica del disco stesso.

Alla luce di ciò, la presenza di gas nel disco è meglio spiegata dalla diffusione passiva lungo un gradiente di concentrazione e pressione, piuttosto che da un'iniezione diretta. I dati di imaging supportati dalla cinetica di diffusione, confermano che la somministrazione intramuscolare-paravertebrale è sufficiente a spiegare i risultati—senza necessità di accedere direttamente al disco.

Basandoci sui coefficienti di diffusione stimati (a  $37^\circ\text{C}$ ):

- $\text{O}_2: \sim 2,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
- $\text{O}_3: \sim 1,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
- $\text{CO}: \sim 2,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
- $\text{NO}: \sim 3,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$
- $\text{N}_2: \sim 2,0 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$

Tempi di diffusione stimati per distanze di 2–3 mm:

- $\text{O}_2 \approx 2,25 \text{ min}$
- $\text{O}_3 \approx 3,75 \text{ min}$
- $\text{CO} \approx 2,14 \text{ min}$
- $\text{NO} \approx 1,36 \text{ min}$

Pertanto, l'intervallo di 3–7 minuti osservato per l'insorgenza dell'ipodensità è coerente con la diffusione di ossigeno o ozono.

In conclusione, la combinazione di evidenze anatomiche, biofisiche e di imaging supporta fortemente l'ipotesi secondo cui il gas osservato nel disco

intervertebrale ha origine dalla diffusione in seguito a un'iniezione intramuscolare o paravertebrale. La distribuzione spaziale, i tempi e la dinamica del gas non sono compatibili con un'iniezione diretta nel disco o foramen, ma validano un modello di diffusione passiva, fisiologicamente coerente.

## 7. Limitazioni e prospettive

Sebbene lo studio fornisca un solido supporto all'approccio intramuscolare con ossigeno–ozono, devono essere riconosciute diverse limitazioni. La meta-analisi include solo sette studi, con un'eterogeneità metodologica tra gli studi randomizzati controllati (per l'approccio intramuscolare) e studi osservazionali o pre-post (per l'approccio intradiscale). Questo squilibrio potrebbe influenzare negativamente le conclusioni comparative. Inoltre, la dimensione complessiva del campione è ridotta, il che limita la potenza statistica e la generalizzabilità dei risultati.

Le immagini TC sono state incluse come dimostrazione preliminare, una prova di concetto, per supportare la plausibilità della migrazione del gas attraverso microfessure dell'anulus in seguito a un'iniezione paravertebrale. Non erano intese come prova definitiva di un meccanismo generalizzabile. Abbiamo revisionato il manoscritto per riflettere chiaramente questa limitazione e abbiamo sottolineato che tale osservazione rappresenta un punto di partenza per studi futuri che coinvolgano imaging sistematico su coorti più ampie per convalidare l'ipotesi.

I dati di imaging che supportano la diffusione del gas dopo iniezioni intramuscolari derivano da un singolo caso esemplificativo e, sebbene convincenti, non sono stati replicati su popolazioni più ampie. Anche la breve durata del follow-up in molti degli studi inclusi limita la comprensione degli esiti a lungo termine e dei tassi di recidiva. Inoltre, sebbene la modellazione biofisica e l'imaging TC suggeriscano una plausibile diffusione nello spazio discale, tali risultati necessitano di essere confermati tramite studi di imaging controllati, con punti temporali standardizzati e variabilità tra i pazienti.

Non vi è inoltre un controllo sufficiente per variabili confondenti come il livello di attività del paziente, la morfologia del disco o l'infiammazione preesistente. Infine, il potenziale bias dell'osservatore e la variabilità nelle concentrazioni di ozono o nei protocolli di somministrazione tra i vari studi complicano ulteriormente l'interpretazione. Queste limitazioni evidenziano la necessità di studi RCT multicentrici di dimensioni maggiori che confrontino protocolli standardizzati intramuscolari e intradiscal, con endpoint clinici e di imaging coerenti, per confermare sicurezza, efficacia e i meccanismi fisiologici sottostanti agli effetti osservati.

Inoltre, anche se la dimensione dell'effetto aggregato per la terapia intradiscale (ID) (Hedges'  $g = 2,87$ ) appare numericamente superiore a quella osservata per l'approccio intramuscolare (IM) (Hedges'  $g = -1,55$ ), questa apparente superiorità deve essere interpretata con cautela, poiché i dati ID derivano esclusivamente da studi di coorte non controllati, caratterizzati da un'elevata eterogeneità ( $\tau^2 = 4,92$ ), mentre i dati IM provengono da studi randomizzati controllati (RCT) con una varianza tra studi sostanzialmente inferiore ( $\tau^2 = 0,13$ ). Pertanto, l'assenza di gruppi di controllo negli studi ID potrebbe aver gonfiato gli effetti terapeutici osservati, e sottolineiamo quindi che sia la magnitudo dell'effetto che il rigore metodologico—compresi il disegno dello studio, la varianza e il rischio di bias—devono essere attentamente considerati nel valutare l'efficacia terapeutica e nell'informare le decisioni cliniche.

Le evidenze presentate in questo studio supportano in modo decisivo l'approccio intramuscolare rispetto a quello intradiscale nel trattamento dell'ernia del disco spinale tramite ossigeno–ozono terapia e valutano i protocolli raccomandati dalla Società Scientifica Italiana di Ossigeno–Ozonoterapia (SIOOT). I dati indicano non solo un profilo di rischio significativamente più sicuro, ma anche

un risultato terapeutico altamente efficace che mette in discussione le precedenti assunzioni a favore dell'iniezione diretta nel disco. È particolarmente rilevante che i dati di imaging che documentano la diffusione dell'ozono nel disco intervertebrale da una via intramuscolare convalidino la plausibilità biologica di questo metodo. Ciò cambia fondamentalmente la narrazione: non è necessario introdurre forzatamente l'ozono nel nucleo discale per ottenere effetti terapeutici. Al contrario, la miscela gassosa può raggiungere il disco tramite diffusione passiva, specialmente quando il disco è già degenerato e permeabile.

I risultati della meta-analisi, sebbene con un impatto modesto, rafforzano questa tesi con un rapporto di rischio che mostra come le procedure intradiscali siano oltre sei volte più propense a causare complicazioni gravi, incluse infezioni, disciti e lesioni neurologiche. Nel frattempo, l'iniezione intramuscolare, metodo meno invasivo e compatibile con la pratica ambulatoriale, ottiene una riduzione significativa del dolore con un profilo di rischio sostanzialmente inferiore.

Dal punto di vista meccanicistico, l'approccio intramuscolare è più coerente con le moderne conoscenze sulla patologia del disco intervertebrale. Piuttosto che considerare l'erniazione come un mero problema meccanico da risolvere con nucleolisi fisica, questo studio sottolinea la natura immunologica della patologia. La degenerazione discale è oggi intesa come un processo che coinvolge significative componenti infiammatorie e immuno-mediate, con cascate citochiniche, polarizzazione macrofagica e apoptosi cellulare a giocare ruoli dominanti.

L'ozonoterapia intramuscolare agisce efficacemente su queste vie infiammatorie sistemiche e paraspinali, stimolando la risoluzione immunitaria, la difesa antiossidante tramite attivazione di Nrf2 e la riparazione tessutale attraverso la polarizzazione dei macrofagi M2. Questi effetti non sono solo scientificamente robusti, ma anche clinicamente osservabili, poiché i pazienti spesso riferiscono miglioramenti nella mobilità, nella flessibilità e nella riduzione del dolore dopo il trattamento [62–64].

Il dato più convincente è rappresentato dalle immagini TC che mostrano la migrazione dell'ozono nel disco entro pochi minuti dall'iniezione intramuscolare. Ciò mina la credenza di lunga data secondo cui solo l'iniezione diretta nel disco garantirebbe l'accesso terapeutico. Il modello di diffusione presentato è sia anatomicamente che biofisicamente valido, e spiega l'accumulo di gas osservato attraverso principi consolidati delle leggi di Fick. Questo non solo legittima la tecnica intramuscolare, ma mette in discussione la necessità—e la sicurezza—di penetrare direttamente lo spazio discale, esponendo il paziente a una dose significativa di radiazioni, se si impiegano tecniche di imaging.

L'iniezione intradiscale è più invasiva, tecnicamente complessa e comporta un rischio significativo senza un corrispondente miglioramento dell'efficacia aggiustata per la sicurezza. Data la crescente evidenza di eventi avversi, come perdita di liquido cerebrospinale, attivazione autoimmune e infezioni, la sua primazia appare sempre più ingiustificabile.

Pertanto, questo lavoro sostiene in modo convincente la necessità di un cambiamento clinico. L'approccio intramuscolare non è un compromesso, ma una strategia superiore, biologicamente intelligente e più sicura. Affronta l'infiammazione e la degenerazione sottostanti che causano il dolore, preservando al contempo l'integrità strutturale e minimizzando il rischio per il paziente. È tempo di abbandonare paradigmi meccanici pericolosi e obsoleti in favore di terapie più sicure e guidate dall'immunologia, come l'applicazione intramuscolare dell'ozono. Questa rappresenta non solo un'alternativa più sicura, ma una vera e propria evoluzione nella comprensione e nel trattamento della patologia discale spinale.

## 8. Conclusioni

Al contrario, la via intramuscolare o paravertebrale emerge come un'alternativa altamente vantaggiosa, specialmente quando viene eseguita secondo protocolli standardizzati, come quelli della SIOOT (Società Scientifica Italiana di Ossigeno-Ozonoterapia). La sua natura non invasiva, la semplicità di esecuzione e il drastico calo del tasso di complicanze la rendono una scelta decisamente più sicura per la maggior parte dei contesti ambulatoriali.

I dati meta-analitici confermano che il rischio relativo e le probabilità di eventi avversi sono superiori di oltre sei-sette volte nelle procedure intradiscali rispetto a quelle intramuscolari. Ma ancora più importante, nuove evidenze di imaging, come la migrazione ipodensa dell'ozono tracciata con TC, confermano che l'ozono somministrato per via intramuscolare può raggiungere l'unità morfofunzionale del disco nel giro di pochi minuti, validando così la plausibilità biologica della diffusione sistemica e dell'attività immunologica.

Alla base del beneficio terapeutico risiede la capacità dell'ozono di modulare l'infiammazione e attivare le risposte antiossidanti endogene. L'ozono favorisce la polarizzazione dei macrofagi verso il fenotipo M2, riduce l'attività dell'inflamasoma NLRP3, potenzia la protezione citoplasmatica mediata da Nrf2, e promuove il rimodellamento del disco attraverso la segnalazione Gas6/SOCS3. Tutti questi effetti contribuiscono alla regressione dell'ernia del disco tramite meccanismi immuno-mediati, e non attraverso una dissoluzione meccanica.

Tale meccanismo d'azione risulta molto più coerente con la moderna comprensione della patologia discale, oggi vista sempre più come un processo degenerativo attivo, a forte componente infiammatoria e immunitaria. L'approccio intramuscolare all'ozono preserva l'integrità strutturale del disco e sfrutta la capacità innata dell'organismo di guarire, incarnando una strategia terapeutica più moderna e sistemica, che favorisce una risoluzione immunomodulata e sicura, rispetto a un'abrasione chimica potenzialmente distruttiva.

Queste evidenze sostengono fortemente un cambio di paradigma nella terapia con ozono, allineando la pratica clinica alle basi biologiche fondamentali e ai criteri di sicurezza centrati sul paziente.

**Author Contributions:** Conceptualization, S.C., L.V., M.F. and F.V.; methodology, R.A.G., F.G., C.G., L.V., U.T. and P.B.; software, S.C. and G.P.; validation, R.A.G., M.C. and E.M.P.; formal analysis, A.L. and M.F.; investigation, L.V., R.A.G. and F.G.; resources, F.G.; data curation, U.T., F.G. and S.C.; writing—original draft preparation, S.C.; writing—review and editing, S.C. and R.A.G.; visualization, S.C., C.G. and E.M.P.; supervision, R.A.G., P.B., M.F., L.V. and F.V.; project administration, R.A.G. and M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** The investigations were conducted in accordance with the principles outlined in the Declaration of Helsinki (1975, revised in 2013). According to point 23 of this declaration, as approval must be obtained from the local Institutional Review Board (IRB) or another relevant ethics committee prior to conducting the research, ensuring that the study adheres to both national and international guidelines, the IRB of Clinical Comunian (Bergamo, Italy) approved the study prot. 03214/2024, dated 25 January 2024.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Data are available from the Corresponding author on request.

**Acknowledgments:** A special thank to Francesca Turruceni for her precious support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## Abbreviations

AF—Annulus Fibrosus AMPK—AMP-Activated Protein Kinase ARE—Antioxidant Response Element ARI—Absolute Risk Increase BDNF—Brain-Derived Neurotrophic Factor CBP—CREB-Binding Protein CNS—Central Nervous System CO—Carbon Monoxide COSO—Committee of Sponsoring Organizations (Risk Management Framework) CSF—Cerebrospinal Fluid CT—Computed Tomography CTCAE—Common Terminology Criteria for Adverse Events DNA—Deoxyribonucleic Acid DAMPs—Damage-Associated Molecular Patterns EAE—Experimental Autoimmune Encephalomyelitis FE—Fixed Effects GPx—Glutathione Peroxidase HDAC—Histone Deacetylase HDAC9—Histone Deacetylase 9 HO-1—Heme Oxygenase-1 HUVECs—Human Umbilical Vein Endothelial Cells IL—Interleukin IL-1 $\beta$ —Interleukin-1 Beta IL-6—Interleukin-6 IL-8—Interleukin-8 IL-10—Interleukin-10 IL-17—Interleukin-17 IVD—Intervertebral Disc IVDD—Intervertebral Disc Degeneration KEAP1—Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 MMPs—Matrix Metalloproteinases MRI—Magnetic Resonance Imaging NF- $\kappa$ B—Nuclear Factor Kappa B NNH—Number Needed to Harm NO—Nitric Oxide NP—Nucleus Pulposus NRF2—Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 NLRP3—NOD-Like Receptor Pyrin Domain Containing 3 O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub>—Oxygen-Ozone ODI—Oswestry Disability Index OR—Odds Ratio PUFA—Polyunsaturated Fatty Acids RCT—Randomized Controlled Trial ROS—Reactive Oxygen Species RR—Relative Risk SIOOT—Italian Scientific Society of Oxygen–Ozone Therapy SOCS3—Suppressor of Cytokine Signaling 3 STATA—Statistics and Data Analysis Software TGF- $\beta$ —Transforming Growth Factor Beta TLR—Toll-Like Receptor TNF- $\alpha$ —Tumour Necrosis Factor Alpha Treg—Regulatory T Lymphocyte TSDR—Treg-Specific Demethylated Region VAS—Visual Analogue Scale WHO—World Health Organization WoS—Web of Science

## References

1. Rouhi, M.; Mohebi, N.; Yazdi, N. Neurological Adverse Effects Associated with Ozone Therapy. *Clin. Neuroradiol.* **2025**, *35*, 595–599.
2. Khosravi, S.; Mirzaasgari, Z. Cerebral gas embolism and multifocal ischemic stroke during oxygen-ozone therapy: A case report. *BMJ Neurol. Open.* **2024**, *6*, e000885.
3. Marín-Medina, D.S.; Anzueta, J.H.; Ortega-Quintero, A.P.; Carrizosa, J. Severe Complications After Ozone Therapy-related Stroke: A Case Report. *Clin. Neuroradiol.* **2024**, *34*, 511–514.
4. Salaria, A.K.; Dhatt, S.S.; Kumar, V.; Neradi, D.; Sodavarapu, P.; Kumar, N. Mycobacterium tuberculosis Infection of the Spine Secondary to Oxygen–Ozone Therapy for Prolapse Intervertebral Disc: A Scoping Review. *J. Orthop. Case Rep.* **2021**, *11*, 23–26.
5. He, R.; Huang, Q.; Yan, X.; Liu, Y.; Yang, J.; Chen, X. A Case of Paradoxical Embolism Causing Anterior Spinal Cord Syndrome and Acute Myocardial Infarction Following the Intradiscal Oxygen-Ozone Therapy. *Front. Neurol.* **2019**, *10*, 137.
6. Yang, C.S.; Zhang, L.J.; Sun, Z.H.; Yang, L.; Shi, F.D. Acute prevertebral abscess secondary to intradiscal oxygen-ozone chemo-nucleolysis for treatment of a cervical disc herniation. *J. Int. Med. Res.* **2018**, *46*, 2461–2465.

7. Vaiano, A.S.; Valente, C.; De Benedetti, G.; Caramello, G. Transient cortical blindness after intradiscal oxygen-ozone therapy. *Indian J. Ophthalmol.* **2016**, *64*, 944–946.
8. Fort, N.M.; Aichmair, A.; Miller, A.O.; Girardi, F.P. L5-S1 Achromobacter xylosoxidans infection secondary to oxygen-ozone therapy for the treatment of lumbosacral disc herniation: A case report and review of the literature. *Spine* **2014**, *39*, E413–E416.
9. Wu, B.; Chen, L.; Tang, J.; Huang, J.; Feng, H.; Liu, W.; Tan, H. A pyogenic discitis at c3–c4 with associated ventral epidural abscess involving c1–c4 after intradiscal oxygen-ozone chemonucleolysis: A case report. *Spine* **2009**, *34*, E298–E304.
10. Nociti, V.; Picarelli, C.; Losavio, F.A.; Reale, G.; Giuliano, G.; Della Marca, G.; Tumbarello, M. Posterior Reversible Encephalopathy Syndrome After Intramuscular Oxygen-Ozone Therapy. *Can. J. Neurol. Sci.* **2020**, *47*, 416–418.
11. Ezeldin, M.; Leonardi, M.; Princiotta, C.; Dall’oLio, M.; Tharwat, M.; Zaki, M.; Abdel-Wanis, M.E.; Cirillo, L. Percutaneous ozone nucleolysis for lumbar disc herniation. *Neuroradiology* **2018**, *60*, 1231–1241.
12. Rahimi-Movaghari, V.; Eslami, V. The major efficient mechanisms of ozone therapy are obtained in intradiscal procedures. *Pain Physician* **2012**, *15*, E1007–E1008.
13. Jeyaraman, M.; Jeyaraman, N.; Ramasubramanian, S.; Balaji, S.; Nallakumarasamy, A.; Patro, B.P.; Migliorini, F. Ozone therapy in musculoskeletal medicine: A comprehensive review. *Eur. J. Med. Res.* **2024**, *29*, 398.
14. Lehnert, T.; Naguib, N.N.; Wutzler, S.; Nour-Eldin, N.-E.A.; Bauer, R.W.; Kerl, J.M.; Vogl, T.J.; Balzer, J.O. Analysis of disk volume before and after CT-guided intradiscal and periganglionic ozone-oxygen injection for the treatment of lumbar disk herniation. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **2012**, *23*, 1430–1436.
15. Zhang, Y.; Ma, Y.; Jiang, J.; Ding, T.; Wang, J. Treatment of the lumbar disc herniation with intradiscal and intraforaminal injection of oxygen-ozone. *J. Back Musculoskelet. Rehabil.* **2013**, *26*, 317–322.
16. Paoloni, M.; Di Sante, L.; Cacchio, A.; Apuzzo, D.; Marotta, S.; Razzano, M.; Franzini, M.; Santilli, V. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of acute back pain with lumbar disc herniation: A multicenter, randomized, double-blind, clinical trial of active and simulated lumbar paravertebral injection. *Spine* **2009**, *34*, 1337–1344.
17. Biazzo, A.; Corriero, A.S.; Confalonieri, N. Intramuscular oxygen-ozone therapy in the treatment of low back pain. *Acta Biomed.* **2018**, *89*, 41–46.
18. Ucar, D.; Uçar, S.; Özcan, Ç.; Polat, Ö.; Çaçan, M.A.; Uçar, B.Y. Retrospective observational study of intramuscular oxygen-ozone therapy for the treatment of neck pain: Cervical paravertebral injection. *Med. Gas. Res.* **2020**, *10*, 170–173.
19. Kelekis, A.; Bonaldi, G.; Cianfoni, A.; Filippiadis, D.; Scarone, P.; Bernucci, C.; Hooper, D.M.; Benhabib, H.; Murphy, K.; Buric, J. Intradiscal oxygen-ozone chemonucleolysis versus microdiscectomy for lumbar disc herniation radiculopathy: A non-inferiority randomized control trial. *Spine J.* **2022**, *22*, 895–909.
20. Giurazza, F.; Guarnieri, G.; Murphy, K.J.; Muto, M. Intradiscal O<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Rationale, Injection Technique, Short- and Long-term Outcomes for the Treatment of Low Back Pain Due to Disc Herniation. *Can. Assoc. Radiol. J.* **2017**, *68*, 171–177.
21. Ghatge, S.B.; Shah, R.P.; Surya, N.; Sankhala, S.; Unadkat, C.J.; Khan, G.M.; Modi, D.B. Ozone disc nucleolysis in cervical intervertebral disc herniation: A nonrandomized prospective analysis in 246 patients. *J. Craniovertebr. Junction Spine* **2022**, *13*, 114–120.
22. Muto, M.; Andreula, C.; Leonardi, M. Treatment of herniated lumbar disc by intradiscal and intraforaminal oxygen-ozone (O<sub>2</sub>–O<sub>3</sub>) injection. *J. Neuroradiol.* **2004**, *31*, 183–189.
23. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE, Chou R, Glanville J, Grimshaw JM, Hróbjartsson A, Lalu MM, Li T, Loder EW, Mayo-Wilson E, McDonald S, McGuinness LA, Stewart LA, Thomas J, Tricco AC, Welch VA, Whiting P, Moher D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. **2021**, *372*:n71.
24. Latini, E.; Nusca, S.M.; Curci, E.R.; Boaretto, D.; Santoboni, F.; Trischitta, D.; Vetrano, M.; Vulpiani, M.C. Intramuscular paravertebral oxygen-ozone therapy for chronic neck pain and low back pain: Evaluation of 6-month clinical outcomes. *Med. Gas. Res.* **2024**, *14*, 6–11.
25. Rania, V.; Marcianò, G.; Casarella, A.; Vocca, C.; Palleria, C.; Calabria, E.; Spaziano, G.; Citraro, R.; De Sarro, G.; Monea, F.; et al. Oxygen-Ozone Therapy in Cervicobrachial Pain: A Real-Life Experience. *J. Clin. Med.* **2022**, *12*, 248.
26. Simon, C.; Le Coroller, T.; Pauly, V.; Creze, M.; Champsaur, P.; Guenoun, D. Intradiscal oxygen-ozone therapy for the treatment of symptomatic lumbar disc herniation: A preliminary study. *J. Neuroradiol.* **2022**, *49*, 180–186.
27. Somma, F.; Gatta, G.; Negro, A.; Tortora, M.; Rea, G.; Tamburrini, S.; Pace, G.; La Tessa, G.M.E.; Caranci, F.; d’Agostino, V. Intradiscal ozone therapy: Fluoroscopic guidance reduces operative time in comparison with CT guidance in patients with lumbar disc herniation. *Radiol. Med.* **2022**, *127*, 526–533.

28. Kilic, M.; Ercalik, T.; Ozdemir, B.; Yilmaz, I.; Oguzoglu, A.S.; Aydin, L.; Sahin, B.; Yilmaz, A.; Musluman, A.M.; Ozdemir, H.M. Lumbar Intradiscal Ozone Chemonucleolysis Applied Together with the Epidural Steroid Treatment. *Sisli Efyal Hastan. Tip Bul.* **2021**, *55*, 203–209.
29. Yadav, R.K.; Sherpa, T.; Hamal, P.K.; Pokhrel, N.; Thakur, J.P.; Amatya, S.P.; Piya, R. Clinical Outcome for Lumbar Disc Herniation Treatment with Intradiscal Oxygen-ozone Therapy. *J. Nepal. Health Res. Coun.* **2024**, *21*, 684–688.
30. Gautam, S.; Rastogi, V.; Jain, A.; Singh, A.P. Comparative evaluation of oxygen-ozone therapy and combined use of oxygen-ozone therapy with percutaneous intradiscal radiofrequency thermocoagulation for the treatment of lumbar disc herniation. *Pain Pract.* **2011**, *11*, 160–166.
31. Chirchiglia, D.; Chirchiglia, P.; Stroscio, C.; Volpentesta, G.; Lavano, A. Suspected Pulmonary Embolism after Oxygen-Ozone Therapy for Low Back Pain. *J. Neurol. Surg. A Cent. Eur. Neurosurg.* **2019**, *80*, 503–506..
32. Chang, M.C.; Choo, Y.J.; Denis, I.; Mares, C.; Majdalani, C.; Yang, S. Effectiveness of intradiscal ozone injections for treating pain following herniated lumbar disc: A systematic review and meta-analysis. *J. Back Musculoskelet. Rehabil.* **2024**, *37*, 1131–1139.
33. Magalhaes, F.N.; Dotta, L.; Sasse, A.; Teixeira, M.J.; Fonoff, E.T. Ozone therapy as a treatment for low back pain secondary to herniated disc: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Pain Physician* **2012**, *15*, E115–E129.
34. Franzini, M.; Vaiano, F.; Tirelli, U.; Chirumbolo, S.; Valdenassi, L. SIOOT recommendations for the optimal application of the oxygen-ozone therapy in clinical medicine. *Int. Immunopharmacol.* **2025**, *145*, 113751.
35. Chirumbolo, S.; Pandolfi, S.; Valdenassi, L.; Chierchia, M.; Franzini, M. Complications During Ozone Therapy as a Result of Malpractice and Lack of Guidelines. *Clin. Neuroradiol.* **2024**, *34*, 719–720.
36. Chirumbolo, S.; Simonetti, V.; Valdenassi, L.; Pandolfi, S.; Vaiano, F.; Franzini, M. Editorial—A practical assessment to prevent serious complications in the use of a gaseous mixture of oxygen-ozone injected by needle-mediated infiltration. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2022**, *26*, 2224–2226.
37. Joller, N.; Peters, A.; Anderson, A.C.; Kuchroo, V.K. Immune checkpoints in central nervous system autoimmunity. *Immunol. Rev.* **2012**, *248*, 122–139.
38. Marshall, L.L.; Trethewie, E.R.; Curtain, C.C. Chemical radiculitis. A clinical, physiological and immunological study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1977**, *129*, 61–67.
39. Li, J.; Wei, G.H.; Huang, H.; Lan, Y.-P.; Liu, B.; Liu, H.; Zhang, W.; Zuo, Y.X. Nerve injury-related autoimmunity activation leads to chronic inflammation and chronic neuropathic pain. *Anesthesiology* **2013**, *118*, 416–429.
40. Ye, F.; Lyu, F.J.; Wang, H.; Zheng, Z. The involvement of immune system in intervertebral disc herniation and degeneration. *JOR Spine* **2022**, *5*, e1196.
41. Rua, R.; McGavern, D.B. Advances in Meningeal Immunity. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 542–559.
42. Çiçek, Ö.; Abdulkadir, A.; Lienkamp, S.S.; Brox, T.; Ronneberger, O. 3D U-Net: Learning Dense Volumetric Segmentation from Sparse Annotation. In: Ourselin, S.; Joskowicz, L.; Sabuncu, M.; Unal, G.; Wells, W. (Eds.) Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention – MICCAI 2016; LNCS 9901; Springer, Cham, 2016; pp. 424–432. doi:10.1007/978-3-319-46723-8\_49
43. Milletari, F.; Navab, N.; Ahmadi, S.A. V-Net: Fully Convolutional Neural Networks for Volumetric Medical Image Segmentation. In: Proceedings of the 2016 4th International Conference on 3D Vision (3DV); IEEE, 2016; pp. 565–571. doi:10.1109/3DV.2016.79.
44. Isensee, F.; Jaeger, P.F.; Kohl, S.A.A.; Petersen, J.; Maier-Hein, K.H. nnU-Net: A Self-Configuring Method for Deep Learning-Based Biomedical Image Segmentation. *Nature Methods* **2021**, *18*(2), 203–211. doi:10.1038/s41592-020-01008-z.
45. MacDougall, J.D.; McCabe, M. Diffusion coefficient of oxygen through tissues. *Nature* **1967**, *215*, 1173–1174.
46. Bonetti, M.; Zambello, A.; Leonardi, M.; Princiotta, C. Herniated disks unchanged over time: Size reduced after oxygen-ozone therapy. *Interv. Neuroradiol.* **2016**, *22*, 466–472.
47. Bonetti, M.; Zambello, A.; Princiotta, C.; Pellicanò, G.; Della Gatta, L.; Muto, M. Non-discogenic low back pain treated with oxygen-ozone: Outcome in selected applications. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2020**, *34* (Suppl. 1), 21–30.
48. Bonetti, M.; Lauritano, D.; Ottaviani, G.M.; Fontana, A.; Zambello, A.; Della Gatta, L.; Muto, M.; Carinci, F. Oxygen-Ozone Therapy Associated with Alpha Lipoic Acid Plus Palmitoylethanolamide and Myrrh versus Ozone Therapy in the Combined Treatment of Sciatic Pain Due to Herniated Discs: Observational Study on 318 Patients. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 5716.
49. Yang, H.; Chen, X.; Chen, J.; Dong, Y.; Huang, Y.; Qin, L.; Tan, J.; Yi, W. The pathogenesis and targeted therapies of intervertebral disc degeneration induced by cartilage endplate inflammation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2024**, *12*, 1492870.
50. Roughley, P.J.; Alini, M.; Antoniou, J. The role of proteoglycans in aging, degeneration and repair of the intervertebral disc. *Biochem. Soc. Trans.* **2002**, *30 Pt 6*, 869–874.

51. Kuhn, A.; Riegger, J.; Teixeira, G.Q.; Huber-Lang, M.; Lambris, J.D.; Neidlinger-Wilke, C.; Brenner, R.E. Terminal Complement Activation Is Induced by Factors Released from Endplate Tissue of Disc Degeneration Patients and Stimulates Expression of Catabolic Enzymes in Annulus Fibrosus Cells. *Cells* **2023**, *12*, 887.
52. Dou, Y.; Zhang, Y.; Liu, Y.; Sun, X.; Liu, X.; Li, B.; Yang, Q. Role of macrophage in intervertebral disc degeneration. *Bone Res.* **2025**, *13*, 15.
53. Shamji, M.F.; Setton, L.A.; Jarvis, W.; So, S.; Chen, J.; Jing, L.; Bullock, R.; Isaacs, R.E.; Brown, C.; Richardson, W.J. Proinflammatory cytokine expression profile in degenerated and herniated human intervertebral disc tissues. *Arthritis Rheum.* **2010**, *62*, 1974–1982.
54. Gao, Y.; Chen, X.; Zheng, G.; Lin, M.; Zhou, H.; Zhang, X. Current status and development direction of immunomodulatory therapy for intervertebral disk degeneration. *Front. Med.* **2023**, *10*, 1289642.
55. Chirumbolo, S.; Valdenassi, L.; Pandolfi, S.; Tirelli, U.; Franzini, M. Medical use of adjunct oxygen-ozone therapy and its impact on the scientific literature to date. *Lancet Reg. Health Am.* **2024**, *35*, 100807.
56. Chirumbolo, S.; Valdenassi, L.; Tirelli, U.; Ricevuti, G.; Pandolfi, S.; Vaiano, F.; Galoforo, A.; Loprete, F.; Simonetti, V.; Chierchia, M.; et al. The Oxygen-Ozone Adjunct Medical Treatment According to the Protocols from the Italian Scientific Society of Oxygen-Ozone Therapy: How Ozone Applications in the Blood Can Influence Clinical Therapy Success via the Modulation of Cell Biology and Immunity. *Biology* **2023**, *12*, 1512.
57. Chirumbolo, S.; Tirelli, U.; Franzini, M.; Pandolfi, S.; Ricevuti, G.; Vaiano, F.; Valdenassi, L. Ozone in the adjunct medical treatment. The round personality of a molecule with hormetic properties. *Hum. Exp. Toxicol.* **2023**, *42*, 9603271231218926.
58. Franzini, M.; Valdenassi, L.; Pandolfi, S.; Tirelli, U.; Ricevuti, G.; Chirumbolo, S. The Role of Ozone as an Nrf2-Keap1-ARE Activator in the Anti-Microbial Activity and Immunity Modulation of Infected Wounds. *Antioxidants* **2023**, *12*, 1985.
59. Ruan, S.; Jia, R.; Hu, L.; Liu, Y.; Tian, Q.; Jiang, K.; Xia, X.; Tao, X.; Liu, W.-T.; Pan, Y.; et al. Ozone promotes macrophage efferocytosis and alleviates neuropathic pain by activating the AMPK/Gas6-Mertk/SOCS3 signaling pathway. *Front. Immunol.* **2024**, *15*, 1455771.
60. Ribeiro-Machado, C.; Santos, S.G.; Amaral, I.A.; Caldeira, J.; Pereira, P.; Barbosa, M.A.; Cunha, C. Macrophage-based therapy for intervertebral disc herniation: Preclinical proof-of-concept. *NPJ Regen. Med.* **2023**, *8*, 34.
61. Muto, M.; Giurazza, F.; Silva, R.P.; Guarnieri, G. Rational approach, technique and selection criteria treating lumbar disk herniations by oxygen-ozone therapy. *Interv. Neuroradiol.* **2016**, *22*, 736–740.
62. Christmas, K.M.; Bassingthwaite, J.B. Equations for O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> solubilities in saline and plasma: Combining temperature and density dependences. *J. Appl. Physiol.* **2017**, *122*, 1313–1320.
63. Andreula, C.F.; Simonetti, L.; De Santis, F.; Agati, R.; Ricci, R.; Leonardi, M. Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2003**, *24*, 996–1000.
64. Chiou, W.L. New perspectives on the theory of permeability and resistance in the study of drug transport and absorption. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1996**, *24*, 433–442.

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.