

UTILIDAD DEL OZONO PARA TERAPIA EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA

G. Elorriaga Sagarduy

*Hospital Universitario Cruces. Barakaldo. Bizkaia
Osakidetza. Servicio Vasco de Salud*

6

Introducción

La terapia de ozono se ha utilizado desde hace casi 40 años. El primer informe sobre terapia de ozono fue publicado por Wolf en 1974. Desde entonces, ha sido utilizada con diferente nivel de penetrancia en diferentes países. Todavía hoy existe reticencia a su uso en países desarrollados debido, por una parte, al mal uso de que ha sido objeto por médicos poco ortodoxos y también por dudas respecto a su posible toxicidad. El ozono en sangre posee una ventana terapéutica tal que, si sobrepasamos el dintel superior, tiene efectos tóxicos sobre las células nobles. Faltan publicaciones con evidencia científica suficiente para recomendar su uso extendido. Pero las terapias realizadas en los últimos 20 años sí han demostrado su utilidad en el tratamiento de diversas patologías, como la isquemia crónica de miembros inferiores complicada con úlceras; procesos infecciosos crónicos sobre todo de la esfera de enfermedades de transmisión sexual como el herpes virus o el papiloma; infecciones vaginales por *Candida*, *Chlamydia* o *Trichomonas*; enfermedad degenerativa discal; y también la odontología es un área en que se muestra muy eficaz tanto en caries dentales como aftas bucales. El ozono es un eficaz desinfectante, además de activar la proliferación del fibroblasto y es este mecanismo dual el que lo coloca en mejor posición frente a los factores de crecimiento, que no poseen la misma capacidad antiinfecciosa.

En este artículo vamos a repasar conceptos sobre su mecanismo de acción e indicaciones terapéuticas tanto en su uso sistémico en forma de autohemoterapia como en su uso local como agua, gas o aceite ozonizado. Finalmente, revisaremos la literatura publicada durante la última década.



<https://doi.org/10.24129/j.mact.0901.fs1705010>

© 2017 SEMCPT. Publicado por Imaidea Interactiva en FONDOSCIENCE® (www.fondoscience.com).

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (www.creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Mecanismo de acción

El ozono, molécula compuesta por 3 átomos de oxígeno (O_3), es una molécula inestable que, puesta en contacto con la sangre humana, es rápidamente neutralizada por los sistemas antioxidantes de que dispone la sangre (ácido úrico, ácido ascórbico, glutatión) y por compuestos lipídicos presentes en el plasma humano que en conjunto denominamos PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) y también por los grupos SH de la albúmina.

No existe un receptor celular para el ozono, de manera que su actividad no es directa sino aquella que deriva de los mediadores que se generan a partir del ozono. Podemos considerar a la molécula de ozono como un profármaco, pues de esa reacción entre el ozono y los PUFA se generan 2 tipos de mensajeros que van a ser los responsables del efecto farmacológico y terapéutico del ozono. Por un lado, se forman compuestos denominados ROS que poseen una vida media muy corta (menos de un segundo) pero con la capacidad de generar un efecto terapéutico muy importante en ese escaso tiempo. El más importante es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El otro tipo de compuestos generados a partir de la oxidación lipídica son los llamados alquenes, que son productos derivados de la oxidación lipídica, también denominados LOP, con una vida media más larga. Destacan el 4-hidroxi-2E-nonenal (4-HNE) y el 4-hidroxi-2E-hexenal (4-HHE)⁽¹⁾.

Efectos mediados por el H_2O_2

Hemos dicho que la vida media del H_2O_2 en sangre es corta, menos de un segundo, por ser neutralizado por los sistemas antioxidantes presentes en el plasma. Estos sistemas se recuperan a su nivel inicial a los 20 minutos de la exposición al ozono.

La eficacia terapéutica del ozono dependerá de la dosis de exposición. Dosis bajas con un nivel sanguíneo menor de $10 \mu\text{g}$ de O_3/mL de sangre serán ineficaces por ser neutralizado el ozono por los sistemas antioxidantes del plasma, y dosis con un nivel sanguíneo mayor de $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ de sangre serán tóxicas por sobrepasar la capacidad neutralizadora del sistema antioxidante del plasma y se producirá hemólisis de las células sanguíneas. Por tanto, la ventana terapéutica del

ozono se sitúa entre esas 2 cifras de 10 y $80 \mu\text{g}$ por mL de sangre⁽²⁾.

Dentro de ese margen terapéutico del ozono y en grado creciente en relación con la dosis, se producirá un gradiente de H_2O_2 entre el plasma y el medio intracelular que desencadenará una serie de reacciones cruciales en las células sanguíneas, que se detallan a continuación.

El eritrocito

Se acelera la actividad de la fosfofructocinasa y ello provoca un aumento del nivel intracelular del ATP (adenosina trifosfato) y del 2,3-DPG (difosfoglicerato). La consecuencia es una desviación hacia la derecha de la curva de la oxihemoglobina por el efecto Bohr. Se mejora así la oxigenación tisular debido a que la unión química del oxígeno a la hemoglobina es más atenuada y se facilita la extracción del oxígeno por los tejidos isquémicos⁽³⁾.

Otro efecto en los eritrocitos, en este caso no mediado por el H_2O_2 sino por los LOP o productos de oxidación lipídica, es la génesis de "eritrocitos superdotados" (*supergifted*)⁽³⁾. Se debería a la activación de la médula ósea por los LOP provocando la génesis de eritrocitos superdotados con mejores características bioquímicas y su efecto duraría entre 2 y 3 meses, el tiempo de vida media de estos eritrocitos.

Los leucocitos

El H_2O_2 actuaría a nivel intracelular en el leucocito activando una tirosina cinasa que actuaría a nivel de la transcripción en el núcleo celular induciendo la síntesis de varias citocinas proinflamatorias (interferón gamma $-\text{IFN-}\gamma-$, factor de necrosis tumoral $-\text{TNF-}$, interleucina 8 $-\text{IL-8-}$) cuyo resultado sería una mejora en la actividad fagocítica de los neutrófilos.

Encontraríamos así un efecto beneficioso para pacientes con una inmunidad deprimida o con procesos infecciosos crónicos⁽⁴⁾.

Las plaquetas

El H_2O_2 produce sobre las plaquetas un efecto de activación que supone la secreción de factores

de crecimiento por las mismas: PDGF-B (factor de crecimiento derivado de plaquetas), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β 1), IL-8 (interleucina 8) y EGF (factor de crecimiento epidérmico). Este efecto mediado por las plaquetas es muy importante para la curación de úlceras en miembros isquémicos y se ve favorecido por la asociación del tratamiento por autohemoterapia ozonizada con terapia local mediante agua o aceites ozonizados⁽⁵⁾.

Efectos mediados por los LOP (productos de oxidación lipídica)

Como hemos antes mencionado, el otro tipo de mensajero para la actividad farmacológica del ozono es a través de los productos generados tras la oxidación de los PUFA o lípidos presentes en el plasma. Entre ellos podemos mencionar: radicales de lipoperóxidos, radicales alcoxilo, lipohidroperóxidos, F2-isoprostanos, aldehídos como la croléina y MDA (malondialdehído) y alquenas hidroxilo terminales, entre los que destacan 4-HNE y 4-HHE⁽⁶⁾.

De entre estos compuestos, el más importante a los efectos de repuesta terapéutica es el 4-HNE⁽⁷⁾. Su importancia radica en que puede ejercer un doble efecto. Reacciona con la albúmina en el nucleófilo accesible de cisteína generando el aducto 4-HNE-Cys y es este el que puede ejercer el efecto terapéutico doble. Por un lado, activa la síntesis de moléculas como gamma-glutamato ligasa cisteína, gamma-glutamil transferasa, gamma-glutamil transpeptidasa, HSP-70 (proteína de choque térmico), HO-1 (hemo-oxigenasa 1) y, lo más importante, enzimas antioxidantes. Aquí es donde podemos entender la paradoja del efecto del ozono como molécula con capacidad de potenciar el efecto antioxidante de la sangre⁽⁸⁾. En segundo lugar, este aducto 4-HNE-Cys puede actuar sobre las células endoteliales activando la síntesis de moléculas NO, CO y H₂S que, ayudadas de la actividad de la molécula HO-1, ejercen una vasodilatación, mejorando así la oxigenación de los tejidos isquémicos^(9,10).

Otro efecto importante es la sensación de bienestar y de aumento de la energía física que el paciente nota durante la terapia con ozono⁽¹¹⁾. No se sabe si ello se debe a los propios mensajeros

del ozono que pueden inducir mayor secreción de hormona del crecimiento, ACTH-cortisol y de hidrocortisona o si es por la mejor oxigenación de los tejidos.

Mecanismo de acción en su utilización tópica (agua, gas o aceites ozonizados)

En caso de utilización tópica, también va a existir un mecanismo de actuación dual:

- Mediado por el H₂O₂. Por un lado, el H₂O₂ será directamente tóxico para las bacterias, virus o hasta hongos que no disponen de los sofisticados sistemas de amortiguación antioxidante de que dispone la sangre humana y provoca la apoptosis celular de estos microorganismos, incluso con exposiciones menores de un segundo. Por otro lado, el H₂O₂ genera en las células del lecho cutáneo la aparición de moléculas proinflamatorias como IL-8, TNF- α y TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), que activarán la respuesta local del sistema inmunitario⁽¹²⁾.

- Mediado a través de LOP. Se aumenta la síntesis local de HSP (proteína de estrés) y MMP (metaloproteinasas de matriz), cuyo efecto local se centra en el control de la degradación y el remodelado de la matriz extracelular⁽¹²⁾.

Es por tanto la del ozono una acción dual; por un lado, podría eliminar la infección crónica y, por otro, activar la proliferación de los fibroblastos. Ello lo diferencia de los factores de crecimiento que, utilizados en monoterapia en úlceras crónicas, van a ser menos efectivos por no controlar esa infección crónica.

Formas de administración.

Dosis. Toxicidad

Autohemoterapia ozonizada

Actualmente se dispone de generadores de ozono que miden con precisión la cantidad de ozono a administrar.

La ventana terapéutica del ozono es la de una concentración en sangre entre un mínimo de 10 y un máximo de 80 μ g de ozono por mL de sangre. Por debajo de 10 los sistemas antioxidantes del plasma anulan la capacidad de generar mediadores del ozono y por encima de 80 la dosis se

convierte en tóxica y provoca la hemólisis de las células sanguíneas.

Se realizan 2 autotransfusiones semanales reintroduciendo al paciente su sangre ozonizada y puede prolongarse durante varios meses⁽⁵⁾.

Terapia tópica. Aceites ozonizados, aire o agua ozonizada

El agua ozonizada se genera por la mezcla de agua doblemente destilada con gas de ozono, a una dosis de 20 a 100 µg de ozono por mL de agua. La concentración terapéutica será de entre 5 y 25 µg por mL. La mezcla habrá de ser administrada tras su fabricación, pues solo dura 300 horas a 0 °C y 10 horas a 20 °C. Se recomienda mantener la mezcla antes de su administración a 4 °C⁽¹²⁾.

El aire ozonizado se aplica a concentraciones de entre 10 y 80 µg por mL. Se aplica dentro de una bolsa con vapor de agua, pues el ozono se ha de disolver en el agua superficial para poder reaccionar. Tiene utilidad en odontología⁽¹³⁾.

El aceite ozonizado puede ser de oliva, girasol o sésamo. Se considera este tercero el mejor⁽¹²⁾. Se genera una mezcla entre gas ozonizado y el sustrato lipídico, de manera que se forman derivados lipídicos ozonizados responsables del efecto terapéutico.

Tratamiento para el dolor espinal

Tenemos 2 formas de administración para el control del dolor debido a degeneración discal o su efecto irritativo sobre la raíz nerviosa, que se detallan a continuación.

Vía directa

Consiste en la inyección directa intradiscal de una cantidad de entre 3 y 10 mL de mezcla de gas de ozono/oxígeno a la concentración de 30 µg de ozono por mL.

El mecanismo de acción no ha podido ser comprobado anatomopatológicamente en estudios realizados en cerdos, pero se cree que el ozono reaccionaría con el agua intersticial del

núcleo pulposo generando moléculas ROS que degradarían los proteoglicanos del núcleo pulposo herniado haciendo que desaparezca y disminuyendo el efecto irritativo local y el proceso inflamatorio sobre la raíz nerviosa. Por otro lado, se favorece la reorganización de ese núcleo pulposo residual mediado por los factores TGF-β y bFGF (factor básico de crecimiento fibroblástico)⁽¹⁴⁾.

Vía indirecta

Consiste en la administración intramuscular en la musculatura paraespinal bilateral de 5 a 10 mL de gas ozonizado a una concentración de 18 a 20 µg de ozono por mL.

Se administran en general 2 inyecciones simétricas (una dosis total de 10 a 20 mL de gas), repetidas 2 veces por semana, y en total durante 5 a 6 semanas (12 sesiones).

Los porcentajes de éxito rondan el 70-80%, mientras que los efectos adversos aparecen si se administran dosis altas mayores de 20 mL de gas: hipotensión, bradicardia y midriasis.

El mecanismo de acción sería mediado por ROS y LOP generados en el agua intersticial del músculo, de manera que estos mediadores activarían el sistema antinociceptivo descendente, inducirían la liberación de endorfinas, provocarían la degeneración oxidativa de los C-nociceptores y podrían tener un efecto trófico directo en el músculo por oxidación del lactato, neutralización de la acidosis, aumento de la síntesis del ATP, recirculación del ion calcio y resorción del edema⁽¹⁴⁾.

Utilidades terapéuticas

Dolor motivado por degeneración discal

A pesar de no estar bien definido el mecanismo de acción, la mayoría de autores reporta porcentajes de buenos resultados en torno al 80% para la vía directa y del 70% para la indirecta. Ello ha motivado que el uso terapéutico para esta indicación esté ampliamente extendido en países como Italia, España, Alemania, Grecia, Canadá, Cuba, China, Japón e India.

Úlceras en miembros isquémicos o pacientes diabéticos

En este caso, los pacientes se benefician de la asociación de utilizar la terapia local mediante aceites o agua ozonizada sola, o asociada a tratamiento de autohemoterapia. Actúan sinérgicamente, por el efecto antiinfeccioso y regenerador de la matriz extracelular que se consigue con la terapia local, asociada al efecto que a través de la hemoterapia aporta mayor oxigenación de los tejidos periféricos⁽¹⁵⁾.

Degeneración macular mediada por la edad

La degeneración macular en su forma seca se debe a una degeneración progresiva y muerte de los fotorreceptores de la fovea central y del epitelio retineal pigmentado por hipoxia crónica. En un estudio de 90 pacientes seguidos durante 6 años se observa mejoría en la agudeza visual tras una pauta de tratamiento de autohemoterapia⁽¹⁵⁾.

Uso en odontología

Su utilidad en el tratamiento de las caries es ampliamente aceptada; se utiliza en forma de gas ozonizado durante 10 a 20 segundos a una concentración de 4 µg de ozono por mL y administrado cubierto en una copa de silicona que cubre el diente. Todas las bacterias, sobre todo el *Lactobacillus*, se destruyen y se favorece la remineralización del diente⁽¹³⁾.

Revisión de la literatura

Si realizamos una revisión en la literatura de los últimos trabajos publicados en relación con la terapia con ozono, encontramos publicaciones como la de Rosul en 2016 que considera 47 pacientes diabéticos con úlceras de grado I y II de la clasificación Meggitt-Wagner divididos en 2 grupos, A y B, según reciban terapia con o sin ozono, y encuentra mejores resultados con una curación más rápida y una menor estancia hospitalaria en el grupo tratado con ozono (nivel de evidencia III)⁽¹⁶⁾.

Liu y Zhang publican en el 2015 una revisión Cochrane según la cual realizan una revisión bibliográfica para analizar el tratamiento en úlceras en pies diabéticos. Encontraron 3 ensayos clínicos aleatorizados pero 2 con riesgo alto de sesgo general. En los 3 se comparaban grupos de pacientes con úlceras de pies diabéticos tratadas con ozono frente a otras no tratadas. En 2 de los ensayos no se encontraba diferencia significativa. El tercero encontraba menor número de días de ingreso y un mayor porcentaje de reducción del área de la úlcera en los tratados con ozono frente a los tratados solo con antibiótico (nivel de evidencia III)⁽¹⁷⁾.

En 2014 Zhang publica un ensayo clínico en el que aleatoriza 50 pacientes con úlcera diabética en estadio II a IV de Wagner en 2 grupos, según asocie o no terapia de ozono. Encuentra diferencias estadísticamente significativas en la reducción del tamaño de la úlcera, así como también en el nivel de factores de crecimiento detectados por biopsia en el día 11 de tratamiento (VEGF, TGF-β, PDGF) (nivel de evidencia Ib)⁽¹⁸⁾.

Wainstein en 2011 publica un estudio aleatorizado para pacientes con úlcera diabética de grados II o III de Wagner, 16 tratados con terapia convencional más ozono y 18 solo con terapia convencional. Encuentra diferencia significativa en el porcentaje de cierre de la úlcera, favorable a los tratados con ozono (nivel de evidencia Ib)⁽¹⁹⁾.

Zubarev en 2011 publica un estudio con 130 pacientes con úlcera diabética tratados con ultrasonidos asociados a ozonoterapia frente a 90 tratados de manera convencional y encuentra mejores resultados en el primer grupo (nivel de evidencia III)⁽²⁰⁾.

Martínez-Sánchez publica en 2005 un ensayo clínico aleatorio de 52 casos frente a 49 controles en pacientes con úlcera diabética. Encuentra mejores resultados en el control de la glucemia, en el área de curación de la lesión y en marcadores de estrés oxidativo y de daño endotelial tras 20 días de tratamiento (nivel de evidencia Ib)⁽²¹⁾.

De Monte en el año 2005 publica 2 casos de úlceras, uno en paciente diabético y otro con vasculitis, que no habían respondido a tratamientos convencionales. Encuentra un resultado bueno tras aplicar autohemoterapia durante varios meses (nivel de evidencia III)⁽²²⁾.

Kulikov en año 2002 publica sus resultados en 118 pacientes con úlceras diabéticas tratadas con

terapia de ozono externa y sistémica, reportando mejores resultados en aquellos tratados de forma combinada externa más sistémica (nivel de evidencia III)⁽²³⁾.

Discusión

Tras analizar la literatura revisada, se hace evidente que, a fecha actual, continuamos sin disponer de suficiente número de artículos con un grado de recomendación A (nivel de evidencia Ia o Ib) para la utilización del ozono en cirugía ortopédica. Además, gran parte de los principales artículos que nos informan con detalle del mecanismo de acción de la molécula de ozono pertenecen a un número reducido de autores.

Este es un artículo de revisión de la literatura publicada en los últimos años para la terapia con ozono y no encontramos trabajos publicados en las principales revistas de impacto para nuestra especialidad de pie y tobillo, ni siquiera en revistas para la cirugía ortopédica en general.

Todo ello se corresponde con la realidad de nuestra práctica diaria, sobre todo en grandes hospitales y en la sanidad pública en España, donde es muy escasa la utilización del ozono en la práctica clínica.

La utilización del ozono como terapia sistémica no es una práctica cómoda para los traumatólogos de nuestro país, por la necesidad de monitorización de la dosis y por los riesgos tóxicos del ozono, en caso de administrarse fuera de ese rango terapéutico.

Para la utilización tópica del ozono y dentro de lo que respecta a nuestra especialidad, sí parece haber una evidencia suficiente que apoya su utilización para la cicatrización de úlceras isquémicas en pies diabéticos y ello gracias a ese mecanismo de acción dual, por una parte anti-infeccioso y por otro lado favoreciendo la cicatrización por el mecanismo de activación del fibroblasto. A pesar de ello, la realidad en nuestra práctica clínica es que hay cierta reticencia a su utilización, quizá debido a la mala prensa provocada por su uso indiscriminado por médicos poco ortodoxos, sobre todo dentro del ámbito de la práctica privada. Tampoco parece ser una molécula atractiva para la industria farmacéutica o los dirigentes sanitarios, de forma que no termina de promocionarse claramente su utilización.

El hecho de que las presentaciones para una utilización tópica tengan una vida media corta no ayuda a extender su uso.

En lo que respecta al uso más extendido en cirugía ortopédica y concretamente a la utilización para el alivio del dolor lumbar tanto en vía directa como indirecta, quizá sea el hecho de que realmente desconocemos con certeza el mecanismo concreto de acción de la molécula del ozono tanto a nivel discal como de la musculatura paraespinal lo que provoca el rechazo de muchos cirujanos ortopédicos para su utilización en la sanidad pública.

Tampoco encontramos publicaciones con un nivel de evidencia suficiente para apoyar la utilización del ozono como agente local en tendinopatías, ya sean inflamatorias o degenerativas, y ello a pesar de que tiene un potencial efecto potenciador sobre el fibroblasto.

Por todo ello y tras la revisión realizada de la literatura, considero que actualmente solo existe una evidencia científica suficiente y que apoya una recomendación para el uso de productos ozonizados para la curación de úlceras isquémicas en miembros inferiores sobre todo si tienen una infección sobreañadida. En aquellos centros en los que dispongamos de una colaboración para trabajo en grupo con la unidad de hematología que nos permita trabajar dentro de un rango terapéutico de seguridad respecto a la toxicidad, también creo que sería hoy en día una práctica recomendable la realización de terapia combinada local más sistémica.

Bibliografía

1. Aldini G, Vistoli G, Regazzoni L, Gamberoni L, Facino RM, Yamaguchi S, et al. Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species? *Chem Res Toxicol.* 2008;21(4):824-35.
2. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Med Res Rev.* 2009;29(4):646-82.
3. Bocci V. *Oxygen-Ozone Therapy: A Critical Evaluation.* Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher; 2002.
4. Bocci V, Paulesu L. Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica.* 1990;75(6):510-5.

5. Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators Inflamm.* 2004;13(1):3-11.
6. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hermetic dose-response relationship. *J Transl Med.* 2011;9:66.
7. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(7):937-45.
8. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Oxygen-Ozone Therapy: a critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Med Gas Res.* 2011;1(1):6.
9. Valacchi G, Bocci V. Studies on the biological effects of ozone: 11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators Inflamm.* 2000;9(6):271-6.
10. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Potentiality of oxygen-ozone therapy to improve the health of aging people. *Curr Aging Sci.* 2010;3(3):177-87.
11. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature.* 1996;380:221-6.
12. Travagli V, Zanardi I, Valachi G, Bocci V. Ozone and ozonated oils in skin diseases: a review. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:610418.
13. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life.* 2012;5(1):59-67.
14. Bocci V, Borrelli E, Zanardi I, Travagli V. The usefulness of ozone treatment in spinal pain. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:2677-85.
15. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of action involved in ozone therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res.* 2011;1:29.
16. Rosul M, Patskan B. Ozone therapy effectiveness in patients with ulcerous lesions due to diabetes mellitus. *Wiad Lek.* 2016;69(1):7-9.
17. Liu J, Zhang P, Tian J, Li L, Li J, Tian JH, Yang K. Ozone therapy for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(10):CD008474.
18. Zhang J, Guan M, Xie C, Luo X, Zhang Q, Xue Y. Increased growth factors play a role in wound healing promoted by noninvasive oxygen-ozone therapy in diabetic patients with foot ulcers. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:273475.
19. Wainstein J, Feldbrin Z, Boaz M, Harman-Boehm I. Efficacy of ozone-oxygen therapy for the treatment of diabetic foot ulcers. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13(12):1255-60.
20. Zubarev P, Risman B. Ultrasonic cavitation and ozonation in treatment of patients with pyonecrotic complications of diabetic foot syndrome. *Vestn Khir Im I I Grek.* 2011;170(1):48-53.
21. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005;523(1-3):151-61.
22. De Monte A, van der Zee H, Bocci V. Major ozonated autohemotherapy in chronic limb ischemia with ulcerations. *J Altern Complement Med.* 2005;11(2):363-7.
23. Kulikov AG, Turova EA, Shcherbina TM, Kisileva OM. Efficacy of different methods of ozone therapy in vascular complications of diabetes mellitus. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult.* 2002;(5):17-20.