

УДК 616.72-002-085.276-092.9(045)

DOI: <http://dx.doi.org/10.15674/0030-59872025384-90>

Вплив карбокситерапії та її комбінації з диклофенаком натрію і хондроїтину сульфату на експресію TNF- α та TGF- β 1 за остеоартриту, індукованого моноіодоцтовою кислотою в щурів

В. В. Штробля¹, Р. В. Луценко²

¹ Ужгородський національний університет. Україна

² Полтавський державний медичний університет. Україна

Osteoarthritis remains one of the leading causes of disability worldwide, associated with chronic inflammation and progressive destruction of articular cartilage. Current therapeutic approaches show limited efficacy in restoring damaged tissues, which drives interest in novel adjuvant methods, particularly physiotherapeutic techniques such as carboxytherapy. Objective. To investigate the effects of carbon dioxide monotherapy and its combinations with diclofenac sodium or chondroitin sulfate on the expression of the pro-inflammatory cytokine TNF- α and the regenerative factor TGF- β 1 in rats with experimentally induced osteoarthritis. Methods. An osteoarthritis model was induced by intra-articular injection of moniodoacetic acid. Treatment included CO₂ monotherapy or its combination with chondroitin sulfate or diclofenac sodium. On days 14 and 28, serum levels of TNF- α and TGF- β 1 were measured using the ELISA method. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; 95 % confidence intervals and effect sizes (Cohen's d) were calculated. Results. All interventions involving CO₂ led to a statistically significant reduction in TNF- α levels on days 14 and 28 (ANOVA: $F = 2551$ and $F = 4057$, respectively; $p < 0.001$), with the most pronounced effect observed in the «CO₂ + diclofenac» group (a decrease of -54.7 %). Concurrently, an increase in TGF- β 1 levels was noted across all treatment groups (ANOVA: $F = 1492$ and $F = 3492$; $p < 0.001$), particularly in the «CO₂ + chondroitin» group (+99.4 % compared to the pathology group). Large effect sizes were recorded for key comparisons (Cohen's $d > 0.8$), indicating the clinical relevance of the observed changes. Conclusions. The combined application of carboxytherapy with diclofenac sodium or chondroitin sulfate promotes a reduction in inflammatory response and activation of regenerative mechanisms in an osteoarthritis model, supporting the rationale for further preclinical and clinical investigations. Keywords. Osteoarthritis; carboxytherapy; CO₂; diclofenac sodium; chondroitin sulfate; TNF- α ; TGF- β 1; experimental model; moniodoacetic acid; combined treatment.

Остеоартрит залишається однією з провідних причин інвалідизації у світі через хронічні запалення і поступову деструкцію суглобового хряща. Сучасні терапевтичні підходи мають обмежену ефективність у відновленні уражених тканин, що зумовлює інтерес до нових ад'ювантних методів, зокрема фізіотерапевтичних, таких як карбокситерапія. Мета. Дослідити вплив монотерапії вуглекислим газом і його комбінацій з диклофенаком натрію або хондроїтином сульфатом на експресію прозапального цитокіну TNF- α і регенераторного фактора TGF- β 1 у щурів із експериментальним остеоартритом. Методи. Модель остеоартриту відтворювали шляхом внутрішньосуглобового введення моноіодоцтової кислоти. Лікування включало монотерапію CO₂ або його поєднання з хондроїтином сульфатом чи диклофенаком натрію. На 14-й і 28-й день визначали рівні TNF- α і TGF- β 1 у сироватці крові методом ELISA. Для статистичного аналізу застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) з пост-хок тестом Тьюкі; обчислювали 95 % довірчі інтервали й ефекти розміру (Cohen's d). Результати. Усі втручання, що включали CO₂, спричиняли статистично значуще зниження рівня TNF- α на 14-й і 28-й день (ANOVA: $F = 2551$ та $F = 4057$ відповідно; $p < 0,001$), із найбільш вираженим ефектом у групі «CO₂ + диклофенак» (зниження до -54,7 %). Паралельно в усіх терапевтичних групах відзначено підвищення рівня TGF- β 1 (ANOVA: $F = 1492$ і $F = 3492$; $p < 0,001$), особливо в групі «CO₂ + хондроїтин» (+99,4 % до патології). Для основних порівнянь зафіксовано великі розміри ефекту (Cohen's $d > 0,8$), що вказує на клінічну релевантність змін. Висновки. Комбіноване застосування карбокситерапії з диклофенаком натрію або хондроїтином сульфатом спричинює зниження запального компонента й активацію регенераторних механізмів у моделі остеоартриту, що обґрунтовує доцільність подальших доклінічних і клінічних досліджень.

Ключові слова. Остеоартрит; карбокситерапія; CO₂; диклофенак натрію; хондроїтину сульфат; TNF- α ; TGF- β 1; експериментальна модель; моноіодоцтова кислота; комбіноване лікування

Вступ

Остеоартрит (ОА) є однією з найпоширеніших патологій опорно-рухової системи, що уражає понад 300 мільйонів людей у світі, зазнаючи суттєвого зростання через старіння населення [1]. Характеризуючись як хронічне дегенеративно-запальне захворювання суглобів, ОА призводить до значного обмеження рухливості, хронічного болю та зниження якості життя пацієнтів [2]. Його патогенез надзвичайно складний і включає взаємодію локальних (механічних) і системних (метаболических та імунологічних) факторів, що спричиняють прогресуючу дегенерацію суглобового хряща, ремоделювання субхондральної кістки, синовіт і неоангіогенез [3, 4].

Одним із ключових компонентів патофізіології ОА є запалення, опосередковане прозапальними цитокінами, серед яких провідну роль відіграють фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- α) та інтерлейкін-1 β (IL-1 β) [5]. Вони активують сигнальні шляхи NF- κ B і p38MAPK, які індукують експресію матриксних металопротеїназ (ММП), циклооксигенази-2 (COX-2), індукцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) та призводять до апоптозу хондроцитів і деградації позаклітинного матриксу [4, 6]. Крім того, TNF- α здатен порушувати TGF- β -залежну сигнальну трансдукцію у хондроцитах шляхом інгібування Smad-сигналіngu, що, у свою чергу, перешкоджає регенерації хряща та синтезу позаклітинного матриксу [7, 8].

Незважаючи на значний прогрес у розумінні патогенезу ОА, ефективних хворобомодифікуючих засобів досі не існує [9]. Основними ліками залишаються нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП), зокрема диклофенак натрію, який хоча й демонструє ефективність у купіруванні болю, але за тривалого використання має серйозні побічні ефекти (шлунково-кишкові, ниркові, серцево-судинні) [10, 11]. Це стимулює наукову спільноту до пошуку безпечніших альтернативних або ад'ювантних терапій [12].

Одним із перспективних напрямів є карбокситерапія — терапевтичне застосування вуглекислого газу (CO₂) — яка історично використовувалася у разі судинних захворювань, а нині розглядається як можливий протизапальний засіб. Терапія із використанням CO₂ дедалі більше привертає увагу як інструмент модуляції тканинного мікросередовища завдяки покращенню оксигенації, кровотоку, стимуляції ангіогенезу та пригніченню прозапальних цитокінів, таких як TNF- α і IL-6 [15]. Механізми дії CO₂-терапії включають активацію

VEGF і TGF- β , індукцію синтази оксиду азоту та зниження рівня HIF-1 α , що свідчить про її потенційну ефективність у разі ушкоджень, зумовлених гіпоксією та хронічним запаленням.

Особливий науковий інтерес становить можливість комбінованого застосування карбокситерапії (CO₂) із традиційними засобами лікування остеоартриту. Зокрема, припускається, що поєднання CO₂ із НПЗП (наприклад диклофенаком натрію) може потенціювати їхню протизапальну дію, дозволити зменшити необхідну дозу та, відповідно, знизити ризик виникнення побічних ефектів, що є критично важливим за умов хронічного використання НПЗП. Крім того, застосування CO₂ у поєднанні з хондроїтином сульфатом — хондропротектором із відомими регенеративними та частково протизапальними властивостями — потенційно може підсилювати хондрогенез і сприяти стабілізації тканинного мікрооточення. Існують припущення, що CO₂ може одночасно зменшувати запальну відповідь і стимулювати механізми тканинної репарації, зокрема через регуляцію цитокінів.

Водночас вплив комбінованого застосування CO₂ із диклофенаком натрію або хондроїтином сульфатом на експресію ключових прозапальних і протизапальних маркерів у тваринній моделі ОА залишається недостатньо вивченим і потребує подальшого дослідження та верифікації. Під час вивчення ефективності нових терапевтичних підходів широко застосовується модель остеоартриту, індукованого внутрішньосуглобовим введенням моноіодоцтової кислоти (МЙОК), яка достовірно відтворює ключові патоморфологічні ознаки ОА, зокрема синовіт, ерозію хряща, гіперплазію синовіальної оболонки та підвищену експресію TNF- α [13, 14]. Використання цієї моделі дозволяє об'єктивно оцінити біомаркери запалення, а також відслідковувати морфологічні зміни в суглобах під впливом експериментальних втручань.

У попередніх експериментальних дослідженнях нами була продемонстрована ефективність карбокситерапії (CO₂) як у монотерапії, так і в комбінації з традиційними протизапальними засобами (диклофенак натрію, хондроїтину сульфат) на формаліновій та карагеніновій моделях запалення у щурів. Зокрема, виявлено знеболювальні [16], протизапальні [17], та антиоксидантні властивості CO₂ [18, 19]. Комбіноване використання CO₂ із НПЗП або хондропротекторами демонструвало синергічний ефект, який проявлявся в зменшенні інтенсивності болю, набряку, температури, зниженні прозапальних маркерів

(інтегральні індекси запалення й імунної відповіді в шурів із карагеніновою моделлю запалення) і підвищенні антиоксидантного захисту [20, 21]. Отримані результати стали підґрунтям для подальшого вивчення дії CO₂ у моделі ОА в шурів.

Мета: експериментально вивчити вплив монотерапії вуглекислим газом, а також його комбінованого застосування з диклофенаком натрію або хондроїтином сульфатом на рівень експресії фактора некрозу пухлини- α (TNF- α) та трансформуючого фактора росту- β 1 (TGF- β 1) у моделі остеоартрита, індукованого моноіодоцтовою кислотою в шурів.

Матеріал і методи

У дослідженні було використано 80 статевозрілих білих безпородних шурів-самців (маса тіла 180–220 г), яких утримували в стандартних умовах віварію: температура повітря — 21–23 °C, відносна вологість — 50–60 %, світловий режим — 12 год світла / 12 год темряви. Тварини мали вільний доступ до води та стандартного лабораторного корму. Перед початком експерименту всі щури проходили 7-денну акліматизацію. Усі маніпуляції над тваринами здійснювали відповідно до Міжнародної директиви з етичного використання лабораторних тварин (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

Моделю остеоартрозу відтворювали за модифікованими протоколами M. Udo зі співавт. [22] та R. Riewruja зі співавт. [23]. Під ефірним наркозом щурам одноразово вводили 0,05 мл 3 % розчину МЙОК у порожнину правого колінного суглоба задньої кінцівки. Розчин готували *ex tempore* у 0,9 % NaCl. Контрольний (інтактний) групі вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину.

Через 24 год після індукції патології тварини були рандомізовані у 8 груп (по 5 тварин у підгрупі) для оцінки ефектів терапії на 14-й та 28-й день:

- інтактні тварини (I) — без втручання;
- інтактні + NaCl (II) — внутрішньоочеревинне введення 0,9 % NaCl;
- МЙОК (III) — група патології (остеоартроз без лікування);
- МЙОК + диклофенак 8 мг/кг (IV) — внутрішньоочеревинно;
- МЙОК + хондроїтину сульфат 3 мг/кг (V) — внутрішньоочеревинно;
- МЙОК + CO₂ 0,5 мл (VI) — підшкірно, періартикулярно;

– МЙОК + диклофенак натрію 4 мг/кг + CO₂ 0,5 мл (VII) — комбінована терапія;

– МЙОК + хондроїтину сульфат 3 мг/кг + CO₂ 0,5 мл (VIII) — комбінована терапія.

Диклофенак натрію (4 або 8 мг/кг) та хондроїтину сульфат (3 мг/кг) вводили внутрішньоочеревинно кожні 3 доби згідно з протоколом, ґрунтуючись на ефективності таких доз у тваринних моделях остеоартриту [11, 32]. Вуглекислий газ застосовували локально — підшкірно над ураженим коліном (0,5 мл кожні 3 доби) протягом 14 або 28 днів.

На 14-й або 28-й день експерименту тварини підлягали евтаназії відповідно до рекомендацій AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (2020). Для індукції анестезії застосовували тіопентал натрію в дозі 50 мг/кг внутрішньоочеревинно. Стан глибокої анестезії визначали за відсутністю рефлексів (корнеального та болісного) та зниженням частоти дихання. Після підтвердження глибокої анестезії проводили кардіопункцію з наступним забором крові до зупинки серця.

Сироватку отримували центрифугуванням за 3000 об/хв протягом 10 хв за +4 °C та зберігали за –20 °C до моменту аналізу.

Концентрації цитокінів TNF- α та TGF- β 1 у сироватці крові визначали методом сендвіч-ELISA в триразовому повторі з використанням комерційних наборів FineTest® (Китай):

– TNF- α — Rat TNF- α ELISA Kit, кат. № ER1393; діапазон вимірювання: (3,906–250) пг/мл; чутливість: 2,344 пг/мл.

– TGF- β 1 — Rat TGF- β 1 ELISA Kit, кат. № ER1378; діапазон вимірювання: (31,25–2000) пг/мл; чутливість: 18,75 пг/мл.

Перед початком аналізу всі реагенти інкубували за кімнатної температури протягом 20 хв. Промивний буфер готували шляхом розведення дистильованою водою у співвідношенні 1 : 25 відповідно до інструкції виробника.

Оптичну щільність вимірювали за умов довжини хвилі 450 нм за допомогою мікропланшетного фотометра LabLine-026.

Концентрації цитокінів розраховували на основі калібрувальних кривих за допомогою програмного забезпечення CurveExpert 1.4, що забезпечує автоматичний підбір математичної моделі для побудови кривої стандартів.

Динаміку рівнів прозапального цитокіну TNF- α та протизапального медіатора TGF- β 1 у сироватці крові шурів із експериментальним остеоартритом було досліджено на 14-й та 28-й день лікування різними терапевтичними

схемами з використанням карбокситерапії як у разі монотерапії, так і комбінованого застосування з традиційними препаратами (диклофенак натрію, хондроїтину сульфат).

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Jamovi, версія 2.3.21. Результати подано як середнє $\pm$ стандартне відхилення ($M \pm SD$). Нормальність розподілу перевіряли за допомогою тесту Шапіро–Вілکا.

Для міжгрупового порівняння за нормального розподілу застосовували t-тест Велча або ANOVA з пост-хок тестом Тьюкі. У разі відхилення від нормальності використовували критерій Крускала–Волліса з поправкою Бонферроні. Результати вважали статистично значущими за $p < 0,05$. Для основних порівнянь розраховано 95 % довірчі інтервали (CI) та ефекти розміру (Cohen's d), що дає змогу оцінити як статистичну, так і клінічну значущість результатів.

Результати та їх обговорення

У результаті проведеного дослідження встановлено, що за умов одноразового введення піддослідним тваринам у порожнину колінного суглоба 0,05 мл 3 % розчину МЙОК спостерігається довготривале вірогідне підвищення як рівня TNF- α , так і TGF- β 1, що свідчить про наявність запального процесу (табл. 1).

Так, на 14-й день у групі III спостерігалось значне підвищення рівня TNF- α — $(29,97 \pm 0,50)$ pg/ml, що у 4,36 раза перевищувало значення інтактної групи $((6,87 \pm 0,44)$ pg/ml, $p < 0,001$). Усі втручання, що включали застосування CO₂ — як у вигляді монотерапії, так і в комбінації з диклофенаком або хондроїтином — достовірно знижували рівень TNF- α порівняно з групою III (ANOVA: $F = 2\,551$, $df = 7$; $13,5$; $p < 0,001$). Найбільше зниження рівня TNF- α виявлено в групі VII — $(18,81 \pm 0,28)$ pg/ml (зменшення на 37,3 % відносно патології; Mean difference = $-11,16$, 95 % CI $[-11,66; -10,66]$, Cohen's $d = -27,5$; $p < 0,001$). Комбінація хондроїтину з CO₂ також була ефективною: $(22,15 \pm 0,35)$ pg/ml ($-26,1$ %, $p < 0,001$, Cohen's $d = -18,1$).

Різниця в рівні TNF- α між групою III та всіма експериментальними групами, які отримували лікування (IV; V; VI; VII; VIII), була статистично значущою (ANOVA: $F = 2\,551$, $df = 7$; $13,5$; $p < 0,001$).

На 28-й день рівень TNF- α залишався підвищеним у групі III $((29,59 \pm 0,10)$ pg/ml). Найнижчі значення спостерігались у групі VII — $(13,41 \pm 0,52)$ pg/ml ($-54,7$ %, $p < 0,001$; Cohen's

$d = -43,2$), тоді як у групі VIII рівень TNF- α становив $(20,17 \pm 0,45)$ pg/ml ($-31,8$ %; $p < 0,001$; Cohen's $d = -24,3$).

Різниця в рівні TNF- α між групою III та всіма експериментальними групами залишалась статистично значущою на 28-й день спостереження (ANOVA: $F = 4\,057$; $df = 7$; $12,8$; $p < 0,001$).

Отже застосування МЙОК призводило до достовірного підвищення рівня TGF- β 1 — з $(567,12 \pm 19,4)$ pg/ml (інтактні) до $(840,56 \pm 7,87)$ pg/ml у групі III ($+48,2$ %; $p < 0,001$).

На 14-й день найвищий рівень TGF- β 1 зафіксовано в групі VIII — $(1570,12 \pm 18,50)$ pg/ml (збільшення на 86,9 % відносно МЙОК, $p < 0,001$; Mean difference = $+730$, 95 % CI $[704,1; 755,9]$, Cohen's $d = 22,0$). Комбінація CO₂ із диклофенаком також показала ефективність: $(1202,30 \pm 11,56)$ pg/ml ($+43,1$ %; $p < 0,001$; Cohen's $d = 11,6$).

Різниця в рівні TGF- β 1 між групою III та всіма експериментальними групами, які отримували лікування (IV; V; VI; VII; VIII), була статистично значущою (ANOVA: $F = 1\,492$; $df = 7$; $13,5$; $p < 0,001$).

На 28-й день найвище значення рівня TGF- β 1 знову виявлено в групі VIII — $(1658,91 \pm 14,66)$ pg/ml, що на 99,4 % вище за патологію $((831,89 \pm 6,19)$ pg/ml; $p < 0,001$, Mean diff = $+827$, CI $[805,7; 848,3]$, Cohen's $d = 26,7$). Комбінована схема з диклофенаком + CO₂ підтримувала високі значення $((1226,35 \pm 5,91)$ pg/ml, $+394,5$ pg/ml, Cohen's $d = 12,7$, $p < 0,001$).

Різниця в рівні TGF- β 1 між групою III та всіма експериментальними групами залишалась статистично значущою і на 28-й день спостереження (ANOVA: $F = 3\,492$; $df = 7$; $12,6$; $p < 0,001$).

У групах, які отримували лікування (IV; V; VI; VII; VIII), рівень TNF- α достовірно знижувався між 14-м і 28-м днем ($p < 0,001$). Найбільше зниження зафіксовано в групі IV — на 9,28 % (з 25,43 до 23,07 pg/ml).

Паралельно у всіх зазначених терапевтичних групах спостерігалось статистично значуще підвищення рівня TGF- β 1, найвиразніше — у групі V — на 206,2 pg/ml ($+19,5$ %, $p < 0,001$).

У такому разі отримані результати свідчать про перспективність застосування карбокситерапії (CO₂) як монотерапевтичного підходу, а також у поєднанні з НПЗП (диклофенаком натрію) та хондропротекторами (хондроїтину сульфат) в умовах експериментальної моделі ОА, індукованого моноіодоцтовою кислотою. У групах, що отримували CO₂, спостерігалось достовірне зниження рівня TNF- α на 14-й та 28-й день

Таблиця

Вплив CO₂ у монотерапії та комбінаціях на рівні прозапального цитокіну TNF-α та протизапального фактора TGF-β1 у сироватці крові щурів із експериментальним остеоартритом (14-й та 28-й день спостереження)

Група тварин	14-й день TNF-α, pg/ml	28-й день TNF-α, pg/ml	14-й день TGF-β1, pg/ml	28-й день TGF-β1, pg/ml
I	6,87 ± 0,44	6,87 ± 0,44	567,12 ± 19,40	567,12 ± 19,40
II	6,85 ± 0,33	6,85 ± 0,32	572,15 ± 21,25	572,15 ± 21,25
III	29,97 ± 0,50	29,59 ± 0,10	840,56 ± 7,87	831,89 ± 6,19
IV	25,43 ± 0,71***	23,07 ± 0,56***	917,93 ± 7,73***	907,25 ± 1,81***
V	27,90 ± 0,20***	26,55 ± 0,57***	1055,69 ± 26,13***	1261,88 ± 20,63***
VI	28,09 ± 0,66***	26,42 ± 0,35***	1133,62 ± 13,59***	1192,39 ± 20,42***
VII	18,81 ± 0,28***	13,41 ± 0,52***	1202,30 ± 11,56***	1226,35 ± 5,91***
VIII	22,15 ± 0,35***	20,17 ± 0,45***	1570,12 ± 18,50***	1658,91 ± 14,66***
Статистична значущість міжгрупової відмінності	F (7; 13,5) = 2 551, p < 0,001	F (7; 12,8) = 4 057, p < 0,001	F (7; 13,5) = 1 492, p < 0,001	F (7; 12,6) = 3 492, p < 0,001
Тест Шапіро-Вілکا	W = 0,985; P = 0,877	W = 0,986; P = 0,892	W = 0,985; P = 0,849	W = 0,969; P = 0,331

Примітки: Дані подано як середнє значення ± стандартне відхилення (n = 5 у кожній групі). Для всіх змінних не виявлено статистично значущих відхилень від нормального розподілу (тест Шапіро-Вілка, p > 0,05), що дозволило застосувати однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA) із пост-хок тестом Тьюкі. *** p < 0,001 — достовірна відмінність порівняно з групою патології.

експерименту, що свідчить про протизапальний потенціал карбокситерапії. Найбільш виражене зниження (–54,7 %) відносно групи патології зафіксовано в тварин, яким вводили CO₂ у поєднанні з диклофенаком, що дозволяє припускати наявність синергічного ефекту між цими сполуками.

Один із можливих механізмів цієї синергії полягає у впливі CO₂ на MAPK-залежне регулювання прозапальних цитокінів, включаючи TNF-α та IL-6 [24]. Крім того, відомо, що CO₂ сприяє локальній вазодилатації, покращенню мікроциркуляції й активації ендотеліальної NO-синтази, що веде до покращення оксигенації тканин і створення умов для відновлення ушкоджених структур [25, 26]. Хоча більшість таких ефектів досліджено на шкірі, подібні мікросудинні реакції можуть мати значення і для тканин суглоба, особливо субхондральної пластинки.

У нашому дослідженні також було зафіксовано підвищення рівня TGF-β1 — цитокіну, що відіграє важливу роль у хондрогенезі та відновленні хрящового матриксу. Найвищі рівні TGF-β1 (1658,91 ± 14,66) пг/мл виявлено в групі, яка отримувала хондроїтин сульфат у поєднанні з CO₂. Відомо, що TGF-β1 стимулює продукцію агрекану, протеогліканів і колагену II типу у хондроцитах, що забезпечує оновлення екстрацелюлярного матриксу [27].

Отримані дані підкреслюють потенціал карбокситерапії як ад'ювантного підходу під час лікування ОА. Висока експресія TGF-β1 у групі VIII

корелює з активацією репаративних процесів у суглобовому хрящі, що узгоджується з літературними даними про роль TGF-β1 як ключового медіатора хондрогенезу, підтримання гомеостазу тканини та ремоделювання хряща [28]. Водночас варто враховувати, що за тривалої стимуляції TGF-β1 може відігравати і фіброгенну роль, що вимагає подальшого спостереження та морфологічного вивчення довгострокових ефектів.

Непряме підтвердження репаративного потенціалу CO₂ надають дані R. Amano-Iga та співавт. [29], де на моделі шкірного ушкодження доведено, що черезшкірне введення CO₂ стимулює експресію VEGF і TGF-β, а також пригнічує HIF-1α, IL-6 та IL-1β, що супроводжується прискоренням загоєння тканин. Незважаючи на інший тип моделі, загальні механізми — протизапальна дія, активація ростових факторів — можуть бути релевантними і для хрящової тканини. Аналогічно, у дослідженні K. Takeshita і співавт. [30] показано, що гіперкапнічний стан пригнічує цитокін-індуковану активацію NF-κB, а робота С. Brandi та співавт. [31] продемонструвала здатність CO₂ покращувати мікроциркуляцію та стимулювати регенерацію тканин. Ці ефекти створюють сприятливе мікросередовище для репарації, зокрема через стимулювання TGF-β1.

Окрім статистичної достовірності, отримані ефекти мають і потенційно клінічну значущість: значення розміру ефекту (Cohen's d > 0,8) для зниження TNF-α та підвищення TGF-β1 вказують на

виражені біологічні зміни. Це може стати основою для розробки комбінованих терапевтичних стратегій із можливістю зниження дозування НПЗП, що, у свою чергу, дозволить зменшити ризик побічних явищ і потенційно підсилити хондропротекторну дію лікування.

Водночас інтерпретація отриманих результатів має враховувати певні обмеження. По-перше, дослідження проведено на тваринній моделі, яка лише частково відображає патофізіологію остеоартриту людини. По-друге, кількість тварин у кожній групі була лімітованою ($n = 5$), що знижує статистичну потужність. По-третє, дослідження не включало морфологічного аналізу тканин (гістологія, імуногістохімія), що звужує повноту морфофункціональної інтерпретації. Крім того, вивчено лише два цитокіни (TNF- α , TGF- β 1), тоді як інші важливі медіатори запалення та деградації матриксу, такі як IL-1 β , IL-6, IL-17, MMP-13, залишилися поза межами аналізу.

З урахуванням цього, подальші дослідження мають бути спрямовані на розширення молекулярного профілю, морфологічне підтвердження змін у тканинах, збільшення вибірки, а також вивчення ефективності комбінованої терапії CO₂ на клінічних моделях.

Висновки

Карбокситерапія (CO₂) продемонструвала виражений протизапальний ефект, про що свідчить достовірне зниження рівня прозапального цитокіну TNF- α у щурів з експериментальним остеоартритом як на 14-й, так і на 28-й день спостереження.

Застосування CO₂ у комбінації з диклофенаком натрію або хондроїтином сульфатом підсилювало протизапальну дію, забезпечуючи більшу ефективність порівняно з монотерапією. Найбільш виражене зниження рівня TNF- α зафіксовано в групі VII.

Одночасно з протизапальним ефектом, комбіноване лікування зі застосуванням CO₂ сприяло стимуляції репаративних процесів, що підтверджено достовірним підвищенням рівня TGF- β 1, особливо у групі VIII, де зафіксовано найвищі значення цього показника.

Розміри ефекту (Cohen's $d > 0,8$) у ключових порівняннях підтверджують не лише статистичну, а й потенційну клінічну значущість застосування CO₂ як ад'ювантного терапевтичного чинника за остеоартриту.

Отримані дані підтверджують доцільність подальших доклінічних досліджень, спрямованих на з'ясування молекулярних механізмів дії CO₂, із перспективою переходу до клінічних випробу-

вань для розробки комбінованих стратегій лікування ОА з використанням карбокситерапії.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Перспективи подальших досліджень. У перспективі необхідні подальші дослідження, зокрема морфологічна верифікація ефектів CO₂ як у режимі монотерапії, так і за комбінованого застосування з диклофенаком натрію або хондроїтином сульфатом, оцінювання довготривалого впливу на хрящову тканину, а також розширення панелі досліджуваних медіаторів, включаючи цитокіни (IL-1 β , IL-6, VEGF) та ферменти деградації хрящового матриксу — зокрема MMP-1, MMP-3, MMP-13, а також агреканаз ADAMTS-4 і ADAMTS-5. Особливого значення набуває клінічна валідація отриманих результатів — шляхом проведення досліджень щодо ефективності карбокситерапії в поєднанні з диклофенаком або хондроїтином в умовах реальної клінічної практики лікування остеоартриту.

Інформація про фінансування. Автори заявляють про відсутність фінансової зацікавленості під час підготовки цієї статті. Це дослідження не отримало зовнішнього фінансування.

Внесок авторів. Штробля В. В. — концепція дослідження, експериментальна робота, статистичний аналіз, інтерпретація результатів, написання основного тексту статті; Луценко Р. В. — наукове керівництво, корекція дизайну дослідження, критичне редагування, узагальнення висновків.

Список літератури

1. Kloppenburg, M., & Berenbaum, F. (2020). Osteoarthritis year in review 2019: epidemiology and therapy. *Osteoarthritis and cartilage*, 28(3), 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2020.01.002>
2. Perrot, S., & Anne-Priscille, T. (2023). Pain in osteoarthritis from a symptom to a disease. *Best practice & research. clinical rheumatology*, 37(2), 101825. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2023.101825>
3. Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P., & Fahmi, H. (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 7(1), 33–42. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.196>
4. Chen, D., Shen, J., Zhao, W., Wang, T., Han, L., Hamilton, J. L., & Im, H. J. (2017). Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone research*, 5, 16044. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.44>
5. Wojdasiewicz, P., Poniatowski, Ł. A., & Szukiewicz, D. (2014). The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of inflammation*, 2014, 561459. <https://doi.org/10.1155/2014/561459>
6. Kim, J. H., Jeon, J., Shin, M., Won, Y., Lee, M., Kwak, J. S., Lee, G., Rhee, J., Ryu, J. H., Chun, C. H., & Chun, J. S. (2014). Regulation of the catabolic cascade in osteoarthritis by the zinc-ZIP8-MTF1 axis. *Cell*, 156(4), 730–743. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.007>
7. Wang, M., Shen, J., Jin, H., Im, H. J., Sandy, J., & Chen, D. (2011). Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis. *Annals of the New York academy of sciences*, 1240, 61–69. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06258.x>
8. van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2008). Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. Loss of chondrocyte differentiation block during ageing. *Ageing research reviews*, 7(2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2007.10.001>
9. Latourte, A., Kloppenburg, M., & Richette, P. (2020). Emerging pharmaceutical therapies for osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 16(12), 673–688. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-00518-6>
10. Pelletier, J. P., Martel-Pelletier, J., Rannou, F., & Cooper, C. (2016). Efficacy and safety of oral NSAIDs and analgesics in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials

- and surveys. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 45(4 Suppl), S22–S27. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.11.009>
11. Kołodziejaska, J., & Kołodziejczyk, M. (2018). Diclofenac in the treatment of pain in patients with rheumatic diseases. *Reumatologia*, 56(3), 174–183. <https://doi.org/10.5114/reum.2018.76816>
 12. Henrotin, Y., & Mobasheri, A. (2018). Natural Products for Promoting Joint Health and Managing Osteoarthritis. *Current rheumatology reports*, 20(11), 72. <https://doi.org/10.1007/s11926-018-0782-9>
 13. Yoh, S., Kawarai, Y., Hagiwara, S., Orita, S., Nakamura, J., Miyamoto, S., Suzuki, T., Akazawa, T., Shiko, Y., Kawasaki, Y., & Ohtori, S. (2022). Intra-articular injection of monoiodoacetate induces diverse hip osteoarthritis in rats, depending on its dose. *BMC musculoskeletal disorders*, 23(1), 494. <https://doi.org/10.1186/s12891-022-05454-y>
 14. de Sousa Valente J. (2019). The Pharmacology of Pain Associated With the Monoiodoacetate Model of Osteoarthritis. *Frontiers in pharmacology*, 10, 974. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00974>
 15. Prazeres, J., Lima, A., & Ribeiro, G. (2025). Effects of Carbon Dioxide Therapy on Skin Wound Healing. *Biomedicines*, 13(1), 228. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13010228>
 16. Shtroblia, V. V. (2024). Study of the potential analgesic properties of carbon dioxide for pain management in osteoarthritis. *Orthopedics, traumatology and prosthetics*, 3, 70–75. <https://doi.org/10.15674/0030-59872024370-75>
 17. Shtroblia, V. V. (2024). Experimental evaluation of the efficacy of CO₂ in the carrageenan-induced inflammation model. *Orthopedics, traumatology and prosthetics*, 4, 58–63. <https://doi.org/10.15674/0030-59872024458-63>
 18. Shtroblia, V. V., & Lutsenko, R. V. (2024). Investigation of antioxidant activity of carbon dioxide in an acute inflammation model. *Bulletin of problems in biology and medicine*, 1(172), 256–264. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2024-1-172-256-264>
 19. Shtroblia, V. V. (2024). Antioxidant potential of carboxytherapy in a carrageenan-induced inflammation model in rats. *Current issues in modern medicine*, 24(4), 241–245. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.24.4.241>
 20. Shtroblia, V. V. (2025). The effect of CO₂ therapy and its combinations on inflammatory activity and immune status. *Orthopedics, traumatology and prosthetics*, 1, 30–36. <https://doi.org/10.15674/0030-59872025130-36>
 21. Shtroblia, V. V., & Lutsenko, R. V. (2024). Experimental studies of the pharmacological action of carbon dioxide in joint inflammation correction. *Orthopedics, traumatology and prosthetics*, 2, 48–53. <https://doi.org/10.15674/0030-59872024248-53>
 22. Udo, M., Muneta, T., Tsuji, K., Ozeki, N., Nakagawa, Y., Ohara, T., Saito, R., Yanagisawa, K., Koga, H., & Sekiya, I. (2016). Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems. *Osteoarthritis and cartilage*, 24(7), 1284–1291. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.02.005>
 23. Riewruja, K., Makarczyk, M., Alexander, P. G., Gao, Q., Goodman, S. B., Bunnell, B. A., Gold, M. S., & Lin, H. (2022). Experimental models to study osteoarthritis pain and develop therapeutics. *Osteoarthritis and cartilage open*, 4(4), 100306. <https://doi.org/10.1016/j.ocarto.2022.100306>
 24. Gałgańska, H., Jarmuszkiewicz, W., & Gałgański, Ł. (2023). Carbon dioxide and MAPK signalling: Towards therapy for inflammation. *Cell communication and signaling*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01306-x>
 25. Brandi, C., D'Aniello, C., Grimaldi, L., Bosi, B., Dei, I., Lattarulo, P., & Alessandrini, C. (2001). Carbon dioxide therapy in the treatment of localized adiposities: clinical study and histopathological correlations. *Aesthetic plastic surgery*, 25(3), 170–174. <https://doi.org/10.1007/s0026600101167>
 26. Kroumpouzos, G., Arora, G., Kassir, M., Galadari, H., Wolina, U., Lotti, T., Grabbe, S., & Goldust, M. (2022). Carboxytherapy in dermatology. *Clinics in dermatology*, 40(3), 305–309. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2021.08.020>
 27. Finnson, K. W., Chi, Y., Bou-Gharios, G., Leask, A., & Philip, A. (2012). TGF- β signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4(1), 251–268. <https://doi.org/10.2741/S266>
 28. Blaney Davidson, E. N., van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2007). TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*, 15(6), 597–604. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.02.005>
 29. Amano-Iga, R., Hasegawa, T., Takeda, D., Murakami, A., Yatagai, N., Saito, I., Arimoto, S., Kakei, Y., Sakakibara, A., & Akashi, M. (2021). Local Application of Transcutaneous Carbon Dioxide Paste Decreases Inflammation and Accelerates Wound Healing. *Cureus*, 13(11), e19518. <https://doi.org/10.7759/cureus.19518>
 30. Takeshita, K., Suzuki, Y., Nishio, K., Takeuchi, O., Toda, K., Kudo, H., Miyao, N., Ishii, M., Sato, N., Naoki, K., Aoki, T., Suzuki, K., Hiraoka, R., & Yamaguchi, K. (2003). Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor- κ B activation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 29(1), 124–132. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0126OC>
 31. Brandi, C., D'Aniello, C., Grimaldi, L., Caiazza, E., & Stanghellini, E. (2004). Carbon dioxide therapy: effects on skin irregularity and its use as a complement to liposuction. *Aesthetic plastic surgery*, 28(4), 222–225. <https://doi.org/10.1007/s00266-004-2068-z>
 32. Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., D'Ascola, A., Traina, P., & Calatroni, A. (2008). Chondroitin-4-sulphate inhibits NF- κ B translocation and caspase activation in collagen-induced arthritis in mice. *Osteoarthritis and cartilage*, 16(12), 1474–1483. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.04.002>

Стаття надійшла до редакції 18.07.2025	Отримано після рецензування 23.07.2025	Прийнято до друку 27.07.2025
---	---	---------------------------------

THE EFFECT OF CARBOXYTHERAPY AND ITS COMBINATION WITH DICLOFENAC SODIUM AND CHONDROITIN SULFATE ON TNF- α AND TGF- β 1 EXPRESSION IN MONOIODOACETATE-INDUCED OSTEOARTHRITIS IN RATS

V. V. Shtroblia¹, R. V. Lutsenko²

¹ Uzhhorod National University, Ukraine

² Poltava State Medical University, Ukraine

✉ Viktor Shtroblia, MD: viktor.shtroblia@uzhnu.edu.ua; <https://orcid.org/0009-0003-3299-4329>

✉ Ruslan Lutsenko, MD, DMSci, Prof.: farmaluru@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-0277-0458>