

Abstract. *Introduction.* Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disease characterized by multiple motor and non-motor symptoms that lead to a deterioration in the patients' quality of life. It is important to understand how different domains differ in PD patients to improve their quality of life.

The aim of our study was to assess cognitive and motor impairment in different motor subtypes of PD and analyze their relationship with quality of life.

Object and methods. The study included 64 patients with Parkinson's disease, who were divided according to the motor subtype: group 1 – patients with PD subtype with predominance of postural instability and gait disorders (PIGD), group 2 – patients with PD subtype with predominance of tremor or intermediate subtype (non-PIGD). The Unified Parkinson's Disease Rating Scale, the Hoehn and Yahr scale, the Montreal Cognitive Assessment, and the The Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39) were used to examine patients.

Results. We did not find statistically significant differences in the severity of various domains of clinical manifestations, complications of levodopa therapy and cognitive impairment in patients with different motor subtypes of PD. At the same time, patients with PI GD subtype of PD are more prone to higher values of the Hoehn and Yahr stage. It was found that group 1 had a statistically significantly higher score on the «mobility» ($p=0.004$) and «emotional well-being» ($p=0.013$) scales, indicating a greater severity of motor function disorders and psychoemotional disorders in these patients. At the same time, it was found that the score on the «stigmatization» scale was higher in group 2 ($p=0.049$). There were no differences in the scales of «daily activity», «social support», «cognition», «communication» and «body discomfort». The total score on the PDQ-39 scale was higher in group 1 compared to group 2 ($p=0.042$), indicating a worse quality of life. It is presented that the quality of life of patients with CP is closely related to cognitive and motor impairment. At the same time, it has been demonstrated that even with comparable severity of clinical manifestations and cognitive impairment, the PI GD phenotype is associated with poorer quality of life, which may indicate the potential role of non-motor symptoms in causing this phenomenon.

Conclusions. We found a poorer quality of life in patients with PI GD subtype of PD, in particular in the domains of mobility and emotional well-being, while patients with non-PI GD subtype were characterized by a more acute perception of disease stigma, in the absence of differences in the severity of clinical symptoms and cognitive impairment.

Key words: Parkinson disease, quality of life, cognitive impairment, postural instability, motor subtype.

ORCID and contributionship: / ORCID автора та його внесок до статті:

Shkodina A. D.: <https://orcid.org/0000-0002-7198-5498> ^{ABCDEF}

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Shkodina Anastasia Dmytrivna / Шкодін Анастасія Дмитрівна
Poltava State Medical University / Полтавський державний медичний університет
Ukraine, 36000, Poltava, 23 Shevchenko str / Адреса: Україна, 36000, м. Полтава, вул. Шевченка 23
Tel.: +380997182220 / Тел.: +380997182220
E-mail: a.shkodina@pdmu.edu.ua

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 10.10.2023 / Стаття надійшла 10.10.2023 року
Accepted 07.02.2024 / Стаття прийнята до друку 07.02.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-256-264

UDC 616-002.2:612.017-071

¹Shthrobia V. V., ²Lutsenko R. V.

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CARBON DIOXIDE GAS ON THE MODEL OF THE ACUTE INFLAMMATORY REACTION

¹Uzhhorod National University (Uzhhorod, Ukraine)

²Poltava State Medical University (Poltava, Ukraine)

farmaluru@gmail.com

Lipid peroxidation (LPO) is one of the leading causes of inflammation. Therefore, substances that correct it can be considered in the treatment of inflammatory processes.

The aim is to establish the presence of carbon monoxide's antioxidant effect on the model of inflammatory reaction caused by formalin.

In experiments on white rats of both sexes, the presence of antioxidant effect (effect on the content of TBA-AP, the activity of antioxidant (AO) enzymes catalase and superoxide dismutase (SOD) in carbon monoxide (0.5 ml) and in its combination with diclofenac (4 mg/kg) or chondroitin (3 mg/kg) was studied on a model of formalin inflammation. Rectal temperature was measured with an electronic thermometer 5 hours after the start of the experiment.

Formalin-induced inflammation disrupted blood peroxidation processes, manifested by a significant increase in TBA-AP and catalase activity, and hyperthermia developed. Diclofenac, combined with carbon dioxide and chondroi-

tin, did not significantly affect the lipid peroxidation processes and oxidative stress in the blood against the background of formalin-induced inflammation. Carbon dioxide or its combination with chondroitin significantly reduced the content of TBA-AP and catalase activity and, along with diclofenac, corrected the hyperthermic reaction in rats under conditions of experimental pathology.

Carbon dioxide used prophylactically or therapeutically or in combination with chondroitin showed AO, reduced TBA-AP content, and catalase activity in the model of acute inflammation caused by formalin.

Key words: carboxytherapy, CO₂, formalin model of inflammation, lipid peroxidation, enzymes of antioxidant protection, hyperthermia.

Connection of the publication with planned research works.

This fragment is a part of the initiative research topic of the Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Pharmacy of Poltava State Medical University "Pharmacological study of biologically active substances and medicines for the development and optimization of indications for their use in medical practice" (state registration number 0120U103921), as well as the research topic of the Department of General Surgery of the State Higher Educational Institution "Uzhhorod National University" "Complex treatment of patients with polytrauma on the background of endocrine disruptors" (state registration number 0223U004489).

Introduction.

Osteoarthritis (OA) is a major cause of disability and has a significant health and economic burden [1]. Recent studies have shown that oxidative stress caused by excessive lipid peroxidation (LPO) creates an unfavourable cellular microenvironment for chondrocytes. Reactive oxygen species regulate many signalling pathways, activate inflammation, increase metabolic disorders, induce apoptosis, and ultimately lead to OA. Cartilage matrix destruction positively correlates with chondrocyte apoptosis caused by endogenous and exogenous inflammatory factors [2]. Oxidative stress not only destroys cartilage tissue but also participates in the secretion and degradation of inflammatory mediators and contributes to clinically asymptomatic cartilage destruction, leading to OA progression [3]. It is known that oxidative stress is a leading factor and integral to the entire spectrum of OA pathogenesis. Therefore, pharmacological regulation of related signalling pathways may be a promising approach to remission and regression of OA.

Anti-inflammatory and analgesic drugs are the primary strategy for early medical relief of symptoms, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the most commonly used in clinical practice [4]. However, long-term evidence-based medicine shows that long-term use of NSAIDs is associated with severe side effects, including peptic ulcer disease, nervous system dysfunction, and pathology of the blood system and hematopoietic organs [5, 6].

Therefore, safe and effective treatment of OA is urgently needed to reverse pathological processes. In this regard, CO₂ is of interest. It has been shown that CO₂ improves local blood flow velocity, increases microcirculation (long-term effect), increases cyclic adenosine monophosphate levels, activates intra-adipocyte lipase, and increases oxygen release at the tissue level [7, 8].

The aim of the study.

To establish the presence of antioxidant effect of carbon dioxide on the model of inflammatory reaction caused by formalin.

Object and research methods.

Experimental studies were conducted on white rats of both sexes (n=56), weighing 305±9.72; 31 were female (55.4%). Animals were kept in standard vivarium conditions, 5-6 animals, each in standard plastic cages with metal lids, and received standard vitamin feed mixture and water as needed from automatic drinkers. The experiments were conducted in the morning from 9-00 to 12-00 hours. The experiments were carried out following the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1985), the Law of Ukraine "On Protection of Animals from Cruelty" (№3446 – IV 21.02.06). The animals were divided into seven groups of 8 animals each: I – intact control group; II – control pathology; III – control pathology + diclofenac sodium, 8 mg/kg; IV – formalin, 2.5% 0.1 ml (control pathology) + chondroitin, 3 mg/kg; V – control pathology + diclofenac sodium, 4 mg/kg + CO₂, 0.5 ml; VI – control pathology + chondroitin, 3 mg/kg + CO₂, 0.5 ml; VII – control pathology + CO₂, 0.5 ml. The presence of CO₂ antioxidant activity was determined using the aseptic formalin inflammation model. A 2.5% 0.1 ml formalin solution, which destroys membrane proteins, was used as a phlogogen [9]. The antioxidant activity of CO₂ was compared with diclofenac sodium ("Diclofenac sodium" solution for injection 2.5%, 3 ml (75 mg), PJSC "Lekhim-Kharkiv", Ukraine) and chondroitin ("Chondroitin" solution for injection 2 ml (200 mg), PJSC "Lekhim-Kharkiv", Ukraine) and combined with these drugs. Subcutaneous injection of CO₂ using a 30 G 0.30 x 4 mm hypodermic needle in the middle of the A-line segment at an angle of 15-30 degrees in the amount of 0.5 ml.

Twenty-four hours after the formalin test, in vivo blood sampling was performed from a tail vein. The blood content of lipid peroxidation intermediates (LPO) was determined by thiobarbituric acid-reactive products (TBA-AP) and the activity of antioxidant (AO) enzymes catalase and superoxide dismutase (SOD) [10]. Rectal temperature was measured with an electronic thermometer 5 hours after the start of the experiment.

The results were statistically processed using the jamovi software (version 2.3.21). The data were presented as mean values ± standard error (M±m). The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the continuous quantitative data distribution.

As for Levene's test, which showed a statistical difference in homogeneity between the groups, Welch's one-way analysis of variance was applied. When either the one-way ANOVA or Welch's one-way ANOVA showed significant results, Tukey's post hoc test was used to determine which groups in the sample were significantly different. For non-normally distributed quantitative data, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used to

identify statistical differences between groups, and for statistical results from multiple pairwise comparisons, the test was adjusted with the Bonferroni correction to identify groups in the sample that differed significantly. Two-sided tests with a p-value of <0.05 were considered statistically significant.

Results of the study and their discussion.

The antioxidant activity of CO₂ was studied using the model of aseptic formalin inflammation, which simulates inflammatory and painful reactions. Formalin-induced inflammation leads to both local and systemic changes due to the release of inflammatory mediators, particularly prostaglandins. The pain reaction mimics a surgical skin incision, and one of the mechanisms of pain is the activation of the Wasabi receptors (TRPA1 channels), which are sensors of mechanical and chemical irritation [11].

After modelling the inflammatory response, there was a 2.3-fold increase in TBA-AP (p<0.001), a 1.9-fold increase in the activity of the AO enzyme catalase (p<0.001), and no change in SOD activity compared to the intact group of rats (table).

The use of diclofenac in a dose of 8 mg/kg did not significantly change the increased TBA-AP and catalase activity in the blood compared with the control pathology. This indicated the absence of the antioxidant effect of diclofenac in correcting the inflammatory response. Prophylactic and therapeutic administration of chondroitin also did not cause significant changes in lipid peroxidation and antioxidant defence in the blood during the formalin-induced inflammatory reaction. This indicated the absence of an antioxidant component in diclofenac and chondroitin in correcting the inflammatory reaction caused by subplantar injection of formalin. It should be noted that the latter had an antioxidant effect under other experimental conditions (prolonged use of chondroitin) [12].

Adding carbon dioxide in combination with diclofenac did not contribute to the reduction of TBA-AP in the blood compared to the control pathology (table). Also, such a combination improved the activity of catalase compared to the activity of the enzyme in formalin inflammation, but these changes were not probable. The combined use of chondroitin and carbon dioxide reliably reduced the content of LPO intermediates by an average of 1.9 times (p<0.001) compared to the control pathology and compared to the indicators of the group of rats administered only chondroitin. The addition of carbon dioxide to chondroitin during the correction of inflam-

mation with the introduction of formalin contributed to a decrease in catalase activity by 1.5 times (p<0.02) and 1.4 times (p<0.01), respectively, compared to the parameters of the control pathology and the group of animals when using chondroitin (table).

CO₂ correction of the inflammatory reaction caused by formalin had a positive effect on peroxidation processes, this was confirmed by a 1.6 times decrease in the level of TBA-AP in the blood (p<0.01) compared to that in the control pathology group, as well as a probable decrease compared to the use of diclofenac alone or chondroitin. The injection of carbon dioxide reduced the activity of the AO enzyme catalase by an average of 1.9 times (p<0.001) compared to the indicator of the control pathology group, as well as to the groups of pathology correction with diclofenac and chondroitin (table).

Thus, the most significant antioxidant effect in formalin inflammation was found in groups VI formalin + chondroitin + CO₂ and VII formalin + CO₂.

Also, with this pathology, the effect of diclofenac, chondroitin and their combination with carbon dioxide on the development of hyperthermia was studied. It was established that the formalin model of inflammation caused significant and probable hyperthermia. The use of diclofenac reduced the temperature in experimental rats by 1.55°C (p<0.001) compared to control pathology. The appointment of chondroitin, albeit insignificantly, probably prevented the development of hyperthermia in experimental rats (p<0.05). Adding carbon dioxide to diclofenac reduced rectal temperature in experimental animals by 1.7°C (p<0.001) compared to the group with formalin injection without correction. Correction of the experimental pathology with chondroitin and CO₂ probably reduced hyperthermia compared to the values in the control pathology group and when only chondroitin was used. Using carbon dioxide also significantly reduced rectal temperature compared to the control pathology and the chondroitin group (figure).

The decrease in rectal temperature in the groups can be shown as follows: V group (formalin + diclofenac + CO₂) < III (formalin + diclofenac) < VII (formalin + CO₂) < VI (formalin + chondroitin + CO₂) < IV (formalin + chondroitin).

A universal mechanism that plays a crucial role in implementing many biological processes is the activation of free radical processes, which is no exception in the development of inflammation.

The essential biochemical changes in formalin chemical injury are the accumulation of neutral lipids, impaired activity of endoplasmic reticulum membrane enzymes, bioenergetic processes in mitochondria, imbalance of cellular ionic composition due to damage to membrane transport systems, changes in the metabolism of intracellular managers, accumulation of free radicals and changes in the activity of AO enzymes. The detected changes in the

Table – The effect of carbon dioxide on the processes of LPO and AO defence in the blood at subplantar injection of formalin (M±m, n=8)

Animal groups	TBA-AP, μmol/l	Catalase activity, nmol H ₂ O ₂ /min	Superoxide dismutase, % inhibition
1. Intact (control group)	0,024±0,002	0,082±0,006	81,4±5,29
2. Formalin (control pathology)	0,055±0,004*	0,155±0,014*	75,0±2,27
3. Formalin + diclofenac, 8 mg/kg	0,051±0,003	0,148±0,011	78,8±2,02
4. Formalin + chondroitin, 3 mg/kg	0,057±0,004	0,150±0,010	76,9±1,90
5. Formalin + diclofenac, 4 mg/kg + CO ₂ , 0.5 ml	0,051±0,0028	0,134±0,009	80,0±2,24
6. Formalin + chondroitin, 3 mg/kg + CO ₂ , 0.5 ml	0,029±0,003**,##	0,107±0,009**,##	74,25±2,73
7. Formalin + CO ₂ , 0.5 ml	0,035±0,004**,##	0,084±0,008**,##	70,38±2,78#

Notes: 1. * – p<0.05 compared to the control group; 2. ** – p<0.05 compared to the control pathology; 3. # – p<0.05 compared to the formalin + diclofenac group; 4. ## – p<0.05 compared to the formalin + chondroitin group; 5. n – number of animals in the group.

processes of peroxidation and AO defence can be explained by the peculiarity of the initiation of these processes and compensatory capabilities under conditions of formalin inflammation.

As a result of the conducted studies, the antioxidant effect of carbon dioxide during inflammation was established, which was confirmed by the reduction of TBA-AP and the normalization of catalase activity. These data indicate that CO₂ injection can maintain cellular redox balance and enhance the activity of AO enzymes under conditions of oxidative stress. Moreover, CO₂ can protect SOD from damage caused by hydrogen peroxide, although this leads to the formation of carbonate radicals that can propagate oxidative damage. The most significant antioxidant role of CO₂ in vivo is its ability to stabilize the iron-transferrin complex and thereby prevent the participation of this complex in the initiation of free radical reactions [13]. Previous studies confirm the AO action of CO₂ under inflammation conditions, which shows a relationship between CO₂ therapy and oxidative stress, and there is a certain connection. It has been shown that CO₂ plays a protective role in neutralizing free radicals and suppressing oxidative metabolism [13]. A recent study showed that exposure to CO₂ can reduce asymmetric dimethylarginine, a marker of oxidative stress [14].

It is well known that converting arachidonic acid to prostaglandins, especially prostaglandin E₂ is an essential pathway in the central generation of fever. According to the results, CO₂ showed a significant antipyretic effect, evidenced by its effect on the level of prostaglandins, particularly by inhibiting their synthesis.

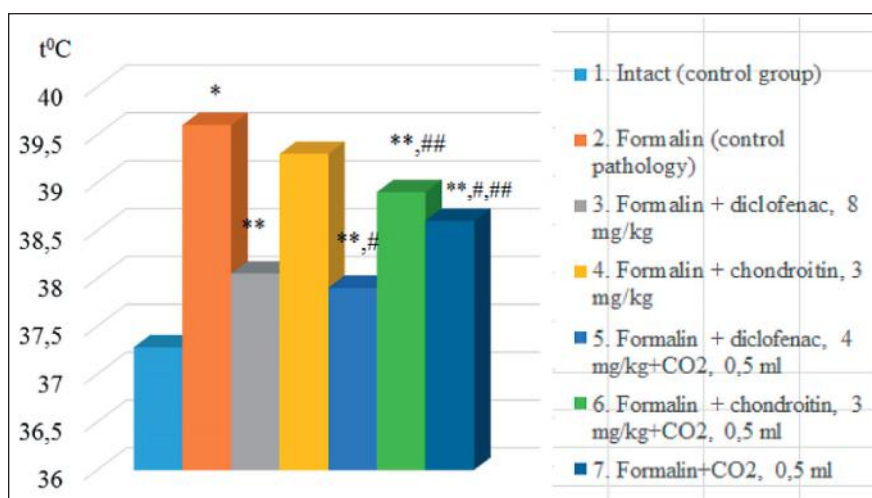


Figure – The effect of carbon dioxide on rectal temperature during subplantar formalin injection.

Notes: 1. * – p<0.05 compared to the control group; 2. ** – p<0.05 compared to the control pathology; 3. # – p<0.05 compared to the formalin + diclofenac group; 4. ## – p<0.05 compared to the formalin + chondroitin group; 5. n – number of animals in the group.

The combination of carbon dioxide with chondroitin showed significant antioxidant activity, which indicated the synergistic effect of these agents on the processes of LPO, AO protection and correction of hyperthermia against the background of inflammation.

Conclusions.

1. An acute inflammatory reaction caused by formalin-activated peroxidation processes and caused hyperthermia.

2. Prophylactic and therapeutic subcutaneous use of carbon dioxide 0.5 ml and its combination with chondroitin 3 mg/kg effectively corrected the LPO, AO protection and hyperthermia processes.

Prospects for further research.

In further studies, the influence of carbon dioxide, diclofenac, chondroitin and their combination on the dynamics of changes in the paw volume and the development of the pain reaction in case of formalin-induced inflammation will be established.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-256-264

УДК 616-002.2:612.017-071

¹Штробя В. В., ²Луценко Р. В.

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ВУГЛЕКИСЛОГО ГАЗУ НА МОДЕЛІ ГОСТРОЇ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ

¹Ужгородський національний університет (м. Ужгород, Україна)

²Полтавський державний медичний університет (м. Полтава, Україна)

farmaluru@gmail.com

Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) є однією з провідних ланок розвитку запалення. Тому речовини, що його коректують, можуть розглядатися в перспективі лікування запальних процесів.

Мета - встановити наявність антиоксидантної дії вуглекислого газу на моделі запальної реакції викликаній формаліном.

В експериментах на білих щурах обох статей на моделі формалінового запалення вивчали наявність антиоксидантної дії (вплив на вміст ТБК-АП, активність антиоксидантних (АО) ферментів каталази і супероксиддисмутази (СОД) у вуглекислого газу (0,5 мл) та у його комбінації з диклофенаком (4 мг/кг) або хондроїтином (3 мг/кг). Ректальну температуру вимірювали електронним градусником через 5 годин від початку експерименту.

Запалення спричинене формаліном порушувало процеси пероксидації в крові, що проявлялось вірогідним збільшенням ТБК-АП і активності каталази, а також розвивалась гіпертермія. Диклофенак,

його комбінація з вуглекислим газом і хондроїтин вірогідно не впливали на процеси ПОЛ і АО у крові на тлі запалення викликаного формаліном. Вуглекислий газ або комбінація його з хондроїтином вірогідно зменшувало вміст ТБК-АП і активність каталази та поряд з диклофенаком коректували гіпертермічну реакцію у щурів за умов експериментальної патології.

Профілактично-лікувальне застосування вуглекислого газу або у комбінації з хондроїтином виявляло АО, зменшувало вміст ТБК-АП і активність каталази на моделі гострого запалення викликаного формаліном.

Ключові слова: карбокситерапія, CO_2 , формалінова модель запалення, перекисне окиснення ліпідів, ферменти антиоксидантного захисту, гіпертермія.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Цей фрагмент входить в ініціативну науково-дослідну тему кафедри фармакології, клінічної фармакології та фармації Полтавського державного медичного університету «Фармакологічне дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів для розробки та оптимізації показань до їх застосування в медичній практиці» (№ державної реєстрації 0120U103921), а також науково-дослідної теми кафедри загальної хірургії Державного вищого навчального закладу «Ужгородський національний університет» «Комплексне лікування хворих із політравмою на фоні ендокринних порушень» (№ державної реєстрації 0223U004489).

Вступ.

Остеоартрит (ОА) є однією з основних причиною інвалідизації та несе значний тягар для здоров'я та економіки [1]. Нещодавні дослідження показали, що окислювальний стрес, викликаний надлишковим перекисним окисненням ліпідів (ПОЛ), створює несприятливе клітинне мікрооточення для хондроцитів. Активні форми кисню регулюють безліч сигнальних шляхів, активують запалення, посилюють метаболічні порушення, індукують апоптоз і зрештою, це все призводить до ОА. Руйнування хрящового матриксу позитивно корелює з апоптозом хондроцитів, спричиненим ендогенними та екзогенними запальними факторами [2]. Окислювальний стрес не тільки руйнує хрящову тканину, а також бере участь у процесі секреції та деградації медіаторів запалення і сприяє клінічно безсимптомному руйнуванню хряща, що призводить до прогресування ОА [3]. Відомо, що окислювальний стрес є провідним чинником і невід'ємними факторами всього спектра патогенезу ОА. Тому фармакологічна регуляція споріднених сигнальних шляхів може бути дуже багатообіцяючим підходом до ремісії, а можливо й регресії ОА.

Протизапальні та анагетичні засоби є основною стратегією раннього медикаментозного полегшення симптомів і нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) використовують найчастіше в клінічній практиці [4]. Однак довгострокова доказова медицина показує, що тривале застосування НПЗП пов'язане із серйозними побічними ефектами, зокрема з виразковою хворобою, дисфункцією нервової системи та патологією системи крові та кровотворних органів [5, 6].

Тому для повернення назад патологічних процесів терміново необхідне безпечне та ефективне лікування ОА. У цьому аспекті цікавість викликає CO_2 . Показано, що CO_2 покращує місцеву швидкість кровотоку; посилює мікроциркуляцію (тривалий ефект), збільшує рівень циклічного аденозинмонофосфату,

активує внутрішньоадипоцитарну ліпазу; і збільшує вивільнення кисню на тканинному рівні [7, 8].

Мета дослідження.

Встановити наявність антиоксидантної дії вуглекислого газу на моделі запальної реакції викликаной формаліном.

Об'єкт і методи дослідження.

Експериментальні дослідження проводили на білих щурах обох статей ($n=56$), масою $305 \pm 9,72$; з них жіночої статі – 31 (55,4%). Тварини перебували в стандартних умовах віварію по 5-6 тварин у стандартних пластикових клітках з металевими кришками, отримували стандартну вітамінізовану кормову суміш і воду за потребою з автоматичних поїлок. Експерименти проводили у першій половині дня з 9-00 до 12-00 годин. Досліди проводили відповідно до вимог Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3446 – IV 21.02.06). Тварини були розділені на сім груп по 8 тварин у кожній: I – група інтактний контроль; II – контрольна патологія; III – контрольна патологія + диклофенак натрію, 8 мг/кг; IV – формалін, 2,5% 0,1 мл (контрольна патологія) + хондроїтин, 3 мг/кг; V – контрольна патологія + диклофенак натрію, 4 мг/кг + CO_2 , 0,5 мл; VI – контрольна патологія + хондроїтин, 3 мг/кг + CO_2 , 0,5 мл; VII – контрольна патологія + CO_2 , 0,5 мл. Встановлення наявності антиоксидантної активності CO_2 проведено на моделі асептичного формалінового запалення. Як флоген використовували 2,5% 0,1 мл розчин формаліну, який викликає деструкцію мембранних протеїнів [9]. Антиоксидантну активність CO_2 порівнювали з диклофенаком натрію («Диклофенак натрію» розчин для ін'єкцій по 2,5% по 3 мл (75 мг) ПрАТ «Лекхім-Харків», Україна) і хондроїтином («Хондроїтин» розчин для ін'єкцій 2 мл (200 мг) ПрАТ «Лекхім-Харків», Україна) та комбінували з цими препаратами. Підшкірне введення CO_2 з використанням голки для підшкірних ін'єкцій 30 G 0,30 x 4 мм, посередині сегмента лінії А, під кутом 15-30 градусів у кількості 0,5 мл.

Через 24 години після проведення формалінового тесту проводили *in vivo* забор крові з вени хвоста. В крові визначали вміст проміжних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за продуктами, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП) і активність антиоксидантних (АО) ферментів каталази і супероксиддисмутази (СОД) [10]. Ректальну температуру вимірювали електронним градусником через 5 годин від початку експерименту.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програми *jamovi* (версія 2.3.21). Дані були представлені як середні величини $\pm$ стандарт-

на похибка ($M \pm m$). Тест Шапіро-Вілکا використовувався для перевірки нормальності безперервного кількісного розподілу даних. Що стосується тесту Левеня, який показав статистичну різницю в однорідності між групами, було застосовано однофакторний дисперсійний аналіз Велча. Коли однофакторний дисперсійний аналіз або однофакторний дисперсійний аналіз Велча показували значущі результати, використовували апостеріорний тест Т'юка, щоб визначити, які групи у вибірці істотно різняться. Для відмінних від нормального розподіленіх кількісних даних використовували непараметричний критерій Крускала-Волліса для виявлення статистичних відмінностей між групами, а для статистичних результатів множинного попарного порівняння тест був скоригований за допомогою поправки Бонферроні для виявлення груп у вибірці, що суттєво різняться. Двосторонні тести з рівнем $p < 0,05$ вважалися статистично значущими.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дослідження антиоксидантної активності CO_2 проводили на моделі асептичного формалінового запалення під час якого моделюється запальна і больова реакція. Запалення, спричинене формаліном, призводить як до місцевих, так і до системних змін, у результаті виділення медіаторів запалення, зокрема простагландинів. Больова реакція імітує операційний шкірний розріз, одним з механізмів виникнення болю є активація рецепторів Васабі (TRPA1-каналів) – сенсорів механічного і хімічного подразнення [11].

Після моделювання запальної реакції відмічалось збільшення ТБК-АП в 2,3 рази ($p < 0,001$), збільшення активності АО ферменту каталази в 1,9 рази ($p < 0,001$) і не змінювалась активність СОД порівняно з інтактною групою щурів (таблиця).

Застосування диклофенаку в дозі 8 мг/кг вірогідно не змінювало підвищений рівень ТБК-АП і активність каталази в крові порівняно з контрольною патологією. Це свідчило про відсутність антиоксидантної дії диклофенаку при корекції запальної реакції. Профілактично-лікувальне введення хондроїтину також не викликало вірогідних змін показників перекисного окиснення ліпідів і АО захисту в крові при індукованій формаліном запальної реакції. Це свідчило про відсутність антиоксидантної складової у диклофенаку та хондроїтину при корекції запальної реакції викликаній субплантарним введенням формаліну. Слід відзначити, що за інших умов експерименту (тривалого застосування хондроїтину), останній виявляв антиоксидантну дію [12].

Додавання вуглекислого газу у комбінацію до диклофенаку не сприяло зменшенню ТБК-АП у крові порівняно з контрольною патологією (таблиця). Також така комбінація покращувала активність каталази порівняно з активністю ферменту при формаліновому запаленні, однак ці зміни не були вірогідними. Ком-

Таблиця – Вплив вуглекислого газу на процеси ПОЛ і АО захисту в крові при субплантарному введенні формаліну ($M \pm m$, $n=8$)

Групи тварин	ТБК-АП, мкмоль/л	Активність каталази, нмоль H_2O_2 /хв	Супероксид-дисмутаза, % гальмування
1. Інтактні (контрольна група)	0,024 $\pm$ 0,002	0,082 $\pm$ 0,006	81,4 $\pm$ 5,29
2. Формалін (контрольна патологія)	0,055 $\pm$ 0,004*	0,155 $\pm$ 0,014*	75,0 $\pm$ 2,27
3. Формалін+диклофенак, 8 мг/кг	0,051 $\pm$ 0,003	0,148 $\pm$ 0,011	78,8 $\pm$ 2,02
4. Формалін+хондроїтин, 3 мг/кг	0,057 $\pm$ 0,004	0,150 $\pm$ 0,010	76,9 $\pm$ 1,90
5. Формалін+диклофенак, 4 мг/кг+ CO_2 , 0,5 мл	0,051 $\pm$ 0,0028	0,134 $\pm$ 0,009	80,0 $\pm$ 2,24
6. Формалін+хондроїтин, 3 мг/кг+ CO_2 , 0,5 мл	0,029 $\pm$ 0,003**##	0,107 $\pm$ 0,009**##	74,25 $\pm$ 2,73
7. Формалін+ CO_2 , 0,5 мл	0,035 $\pm$ 0,004**##	0,084 $\pm$ 0,008**##	70,38 $\pm$ 2,78#

Примітки: 1. * – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою; 2. ** – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною патологією; 3. # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою формалін+диклофенак; 4. ## – $p < 0,05$ у порівнянні з групою формалін + хондроїтин; 5. n – кількість тварин у групі.

біноване застосування хондроїтину і вуглекислого газу вірогідно зменшувало вміст проміжних продуктів ПОЛ в середньому в 1,9 рази ($p < 0,001$) порівняно з контрольною патологією і порівняно з показниками групи щурів з уведенням лише хондроїтину. Додавання вуглекислого газу до хондроїтину при корекції запалення при уведенні формаліну сприяло зниженню активності каталази в 1,5 рази ($p < 0,02$) і в 1,4 ($p < 0,01$) відповідно, порівняно з показниками контрольної патології та з групою тварин при застосуванні хондроїтини (таблиця).

Корекція CO_2 запальної реакції викликаній формаліном позитивно впливало на процеси пероксидації, це підтверджувалось зменшенням рівня ТБК-АП в крові в 1,6 рази ($p < 0,01$) порівняно з таким у групі контрольної патології, а також вірогідним зменшенням порівняно із застосуванням лише диклофенаку чи хондроїтину. Ін'єкція вуглекислого газу зменшувала активність АО ферменту каталази в середньому в 1,9 рази ($p < 0,001$) порівняно з показником групи контрольна патологія, а також з групами корекції патології диклофенаком і хондроїтином (таблиця).

Таким чином, найбільша антиоксидантна дія при формаліновому запаленні виявлялась у групах VI формалін + хондроїтин + CO_2 і у VII формалін + CO_2 .

Також при цій патології досліджували вплив диклофенаку, хондроїтину і їх комбінації з вуглекислим газом на розвиток гіпертермії. Встановлено, що формалінова модель запалення викликала значну і вірогідну гіпертермію. Застосування диклофенаку знижувало температуру в експериментальних щурів на 1,55 $^{\circ}C$ ($p < 0,001$) порівняно з контрольною патологією. Призначення хондроїтину, хоч і незначно, але вірогідно запобігала розвитку гіпертермії в експериментальних щурів ($p < 0,05$). Додавання вуглекислого газу до диклофенаку знижувало ректальну температуру в дослідних тварин на 1,7 $^{\circ}C$ ($p < 0,001$) порівняно з групою з уведенням формаліну без корекції. Корекція експериментальної патології хондроїтином і CO_2 вірогідно знижувало гіпертермію порівняно зі значеннями у групі контрольна патологія і при застосуванні лише хондроїтину. Застосування вуглекислого газу також вірогідно знижувало ректальну температуру порівняно з контрольною патологією і порівняно з групою з уведенням хондроїтину (рисунк).

Зменшення ректальної температури в групах можна показати наступним чином: V група (формалін + диклофенак + CO_2) < III (формалін + диклофе-

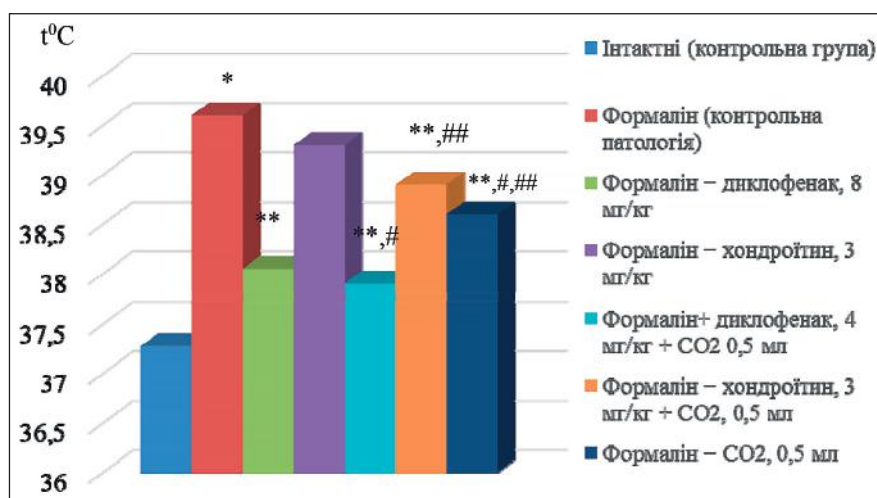


Рисунок – Вплив вуглекислого газу на ректальну температуру при субплантарному введенні формаліну.

Примітки: 1. * – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною групою; 2. ** – $p < 0,05$ у порівнянні з контрольною патологією; 3. # – $p < 0,05$ у порівнянні з групою формалін+диклофенак; 4. ## – $p < 0,05$ у порівнянні з групою формалін + хондроїтин; 5. n – кількість тварин у групі.

нак) < VII (формалін + CO₂) < VI (формалін + хондроїтин + CO₂) < IV (формалін + хондроїтин).

Універсальним механізмом, який відіграє ключову роль у реалізації значної кількості біологічних процесів, є активація вільнорадикальних процесів, не виключенням є і в розвитку запалення.

Найважливішими біохімічними змінами при хімічному ураженні формаліном є накопичення нейтральних ліпідів, порушення активності ферментів мембран ендоплазматичного ретикулюму, біоенергетичних процесів в мітохондріях, дисбаланс іонного складу клітин внаслідок пошкодження мембранних транспортних систем, зміни обміну внутрішньоклітинних менеджерів, накопичення вільних радикалів та зміни активності АО ферментів. Виявлені зміни процесів пероксидації та АО захисту можна пояснити особливістю ініціації цих процесів та компенсаторними можливостями за умов формалінового запалення.

У результаті проведених досліджень встановлено антиоксидантна дія вуглекислого газу при запаленні, яка підтверджувалась зменшенням ТБК-АП і нормалізацією активності каталази. Ці дані вказують на те, що ін'єкція CO₂ здатна підтримувати клітинний окисно-відновний баланс і посилювати активність АО ферментів за умов окиснювального стресу. Більш того, CO₂ може захищати СОД від пошкодження, викликаного перекисом водню, хоча це призводить до утворення карбонатних радикалів, які можуть поши-

рювати окисне пошкодження. Найбільш значна антиоксидантна роль CO₂ in vivo полягає в його здатності стабілізувати комплекс залізо-трансферин і цим запобігати участі цього комплексу в ініціюванні вільнорадикальних реакцій [13]. Виявлена АО дія CO₂ за умов запалення підтверджується попередніми дослідженнями у яких показано, що є взаємозв'язок між терапією CO₂ та окисдаивним стресом є певний зв'язок. Показано, що CO₂ відіграє захисну роль у нейтралізації вільних радикалів та пригніченні окисного метаболізму [13]. Нещодавнє дослідження показало, що дія CO₂ може знизити рівень асиметричного диметиларгініну,

який є маркером окислювального стресу [14].

Загальновідомо, що перетворення арахідонової кислоти на простагландини, особливо простагландин E₂, є важливим шляхом центральної генерації лихоманки. За отриманими результатами CO₂ показав значний жарознижувальний ефект, що може свідчити про його вплив на рівень простагландинів, зокрема шляхом пригнічення їх синтезу.

Комбінування вуглекислого газу з хондроїтином виявляло значну антиоксидантну активність, що свідчило про синергічну направленість дії цих засобів стосовно процесів ПОЛ, АО захисту та корекції гіпертермії на тлі запалення.

Висновки.

Гостра запальна реакція викликана формаліном активувала процеси пероксидації та викликала гіпертермію.

Профілактично-лікувальне підшкірне застосування вуглекислого газу 0,5 мл і його комбінація з хондроїтином 3 мг/кг ефективно коректувало процеси ПОЛ, АО захисту та гіпертермію.

Перспективи подальших досліджень.

В подальших дослідженнях планується встановити вплив вуглекислого газу, диклофенаку, хондроїтину та їх комбінації на динаміку змін об'єму лапки та розвиток больової реакції при запаленні викликаному формаліном.

References / Література

- Hunter DJ, Bierma-Zeinstra S. Osteoarthritis. Lancet (London, England). 2019;393(10182):1745-1759. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30417-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30417-9).
- Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. Ageing research reviews. 2017;40:20-30. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.07.004>.
- Wauchope OR, Mitchener MM, Beavers WN, Galligan JJ, Camarillo JM, Sanders WD, et al. Oxidative stress increases M1dG, a major peroxidation-derived DNA adduct, in mitochondrial DNA. Nucleic acids research. 2018;46(7):3458-3467. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky089>.
- Nakata K, Hanai T, Take Y, Osada T, Tsuchiya T, Shima D, et al. Disease-modifying effects of COX-2 selective inhibitors and non-selective NSAIDs in osteoarthritis: a systematic review. Osteoarthritis and cartilage. 2018;26(10):1263-1273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.05.021>.
- Wongrakpanich S, Wongrakpanich A, Melhado K, Rangaswami J. A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. Ageing and disease. 2018;9(1):143.
- Bjarnason I, Scarpignato C, Holmgren E, Olszewski M, Rainsford KD, Lanás A. Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. Gastroenterology. 2018;154(3):500-514. DOI: [10.1053/j.gastro.2017.10.049](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.049).

7. Lee GS. Quality survey on efficacy of carboxytherapy for localized lipolysis. Journal of cosmetic dermatology. 2016;15(4):484-492. DOI: <https://doi.org/10.1111/jocd.12242>.
8. Di Renzo L, Gualtieri P, Zomparelli S, De Santis GL, Seraceno S, Zuena C, et al. Modified Mediterranean-Ketogenic Diet and Carboxytherapy as Personalized Therapeutic Strategies in Lipedema: A Pilot Study. Nutrients. 2023;15(16):3654. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu15163654>.
9. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2007;104(33):13525-13530.
10. Berkalo LV, Bobovich OV, Bobrova NO, Heyko OO, Kaydashev IP, Kutsenko LO, et al. Metody klinichnykh ta eksperymentalnykh doslidzhen v medytsyni. Poltava: Polimet; 2003. 320 s. [in Ukrainian].
11. Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Caceres AI, Escalera J, Jordt SE. Transient receptor potential ankyrin 1 antagonists block the noxious effects of toxic industrial isocyanates and tear gases. FASEB Journal. 2009;23(4):1102-14. DOI: [10.1096/fj.08-11781](https://doi.org/10.1096/fj.08-11781).
12. Blokhina O, Kot L, Khilko V, Dranytsyna A, Dvorshchenko K. Vilnoradykalni protsesy u syrovattsi krovi shchuriv za umov karrahinan-indukovanoho zapalennia zadnoi kintsivky ta tryvalooho profilaktychnoho vvedennia khondroityna sulfatu. Visnyk Kyivskoho natsionalnoho universytetu imeni Tarasa Shevchenka. 2018;1(25):6-9. [in Ukrainian].
13. Radi R. Interplay of carbon dioxide and peroxide metabolism in mammalian cells. J Biol Chem. 2022;298(9):102358. DOI: [10.1016/j.jbc.2022.102358](https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102358).
14. Nemeth B, Kiss I, Jencsik T, Peter I, Kreska Z, Koszegi T, et al. Angiotensin-converting Enzyme Inhibition Improves the Effectiveness of Transcutaneous Carbon Dioxide Treatment. In vivo (Athens, Greece). 2017;31(3):425-428. DOI: <https://doi.org/10.21873/invivo.11077>.

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ВУГЛЕКИСЛОГО ГАЗУ НА МОДЕЛІ ГОСТРОЇ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ

Штробля В. В., Луценко Р. В.

Резюме. Вступ. Однією з основних причин інвалідизації працездатного населення є остеоартрит (ОА). В основі прогресування цього захворювання є запалення і біль. Перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ) є однією з провідних ланок розвитку запалення. Тому речовини, що його корегують, можуть розглядатися як перспективні засоби для лікування та попередження прогресування ОА.

Мета. Встановити наявність антиоксидантної дії вуглекислого газу на моделі запальної реакції викликаній формаліном.

Об'єкт і методи дослідження. В експериментах на білих щурах (n=56) обох статей на моделі формалінового запалення. У якості флогену використовували формалін 2,5% 0,1 мл, який вводили субплантарно. Вивчали наявність антиоксидантної дії у вуглекислого газу (0,5 мл), диклофенаку (4 мг/кг), хондроїтину (3 мг/кг) та у комбінації з вуглекислим газом, за впливом на вміст ТБК-АП, активність антиоксидантних (АО) ферментів, каталази і (СОД) у крові експериментальних тварин. За цих умов вимірювали електронним градусником ректальну температуру через 5 годин від початку експерименту.

Результати. Запалення, спричинене формаліном, порушувало процеси пероксидації в крові, що проявлялось вірогідним збільшенням ТБК-АП і активності каталази, а також розвивалась гіпертермія. Диклофенак, його комбінація з вуглекислим газом і хондроїтин вірогідно не впливали на процеси ПОЛ і антиоксидантного (АО) захисту в крові на тлі запалення, спричиненого формаліном. Вуглекислий газ і його комбінація з хондроїтином вірогідно зменшували вміст ТБК-АП і активність каталази у крові, а також поряд з диклофенаком, корегували гіпертермічну реакцію у щурів за умов експериментальної патології. Отже, найбільша антиоксидантна дія при формаліновому запаленні виявлялась у групах формалін + хондроїтин + вуглекислий газ і у формалін + вуглекислий газ.

Висновки. Профілактично-лікувальне застосування вуглекислого газу, або у комбінації з хондроїтином, виявляло АО дію, зменшувало вміст ТБК-АП і активність каталази на моделі гострого запалення, викликаного формаліном.

Ключові слова: карбокситерапія, CO₂, формалінова модель запалення, перекисне окиснення ліпідів, ферменти антиоксидантного захисту, гіпертермія.

STUDY OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CARBON DIOXIDE GAS ON THE MODEL OF THE ACUTE INFLAMMATORY REACTION

Shtroblia V. V., Lutsenko R. V.

Abstract. Introduction. Osteoarthritis (OA) is one of the main causes of disability in the working population. The basis of the progression of this disease is inflammation and pain. Peroxidation of lipids (LPO) is one of the leading links in the development of inflammation. Therefore, substances that correct it can be considered as promising means for the treatment and prevention of OA progression.

Goal. To establish the presence of the antioxidant effect of carbon dioxide on the model of the inflammatory reaction caused by formalin.

Materials and methods. In experiments on white rats (n=56) of both sexes on the model of formalin inflammation. Formalin 2.5% 0.1 ml was used as a phlogogen, which was administered subplantarily. They studied the presence of antioxidant activity in carbon dioxide (0.5 ml), diclofenac (4 mg/kg), chondroitin (3 mg/kg) and in combination with carbon dioxide, according to the effect on the content of TBC-active products, the activity of antioxidant (AO) enzymes catalase and (SOD) in the blood of experimental animals. Under these conditions, the rectal temperature was measured with an electronic thermometer 5 hours after the start of the experiment.

Results. The inflammation caused by formalin disturbed the peroxidation processes in the blood, which was manifested by a probable increase in TBC- active products and catalase activity, and hyperthermia developed. Diclofenac, its combination with carbon dioxide and chondroitin probably did not influence the processes of LPO and antioxidant (AO) protection in the blood against the background of formalin-induced inflammation. Carbon dioxide and its combination with chondroitin probably reduced the content of TBC- active products and the activity of catalase in the blood, and together with diclofenac, corrected the hyperthermic reaction in rats under the

conditions of experimental pathology. Therefore, the greatest antioxidant effect in formalin inflammation was found in the formalin + chondroitin + carbon dioxide and formalin + carbon dioxide groups.

Conclusions. Prophylactic and therapeutic use of carbon dioxide, or in combination with chondroitin, showed an AO effect, reduced the content of TBC- active products and catalase activity in the model of acute inflammation caused by formalin.

Key words: carboxytherapy, CO₂, formalin model of inflammation, lipid peroxidation, enzymes of antioxidant protection, hyperthermia.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Shtroblia V. V.: <https://orcid.org/0009-0003-3299-4329>^{ABCD}

Lutsenko R. V.: <https://orcid.org/0000-0003-0277-0458>^{EF}

Conflict of interest: / Конфлікт інтересів:

The Authors declare no conflict of interest / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Lutsenko Ruslan Volodymyrovych / Луценко Руслан Володимирович

Poltava State Medical University / Полтавський державний медичний університет

Ukraine, 36011, Poltava, 23 Shevchenko str. / Адреса: Україна, 36011, м. Полтава, вул. Шевченка 23

Tel.: +380999348001 / Тел.: +380999348001

E-mail: farmaluru@gmail.com

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 10.09.2023 / Стаття надійшла 10.09.2023 року
Accepted 27.02.2024 / Стаття прийнята до друку 27.02.2024 року