



УДК 615.256.51:547.567.5

## ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЙ СИНЕРГИЗМ ТИМОХИНОНА И МЕЛАТОНИНА ПРИ РЕСПИРАТОРНОЙ ГИПОКСИИ

**Рашкевич О.С., Волчек А.В.***Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь*

Изучено антигипоксическое действие комбинации тимохинона и мелатонина при однократном внутрибрюшинном введении на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме у мышей. Рассчитанная методом регрессионного анализа среднеэффективная доза тимохинона на данной модели составила 49 мг/кг, среднеэффективная доза мелатонина – 99 мг/кг. В составе комбинаторного сочетания в соотношении 1 : 1 активность соединений существенно возрастает, ED<sub>50</sub> тимохинона снижается до 6,7 мг/кг, аналогичный показатель мелатонина становится 6,7 мг/кг. Назначение комбинации 10 мг/кг тимохинона и 10 мг/кг мелатонина мышам приводит к увеличению продолжительности их жизни в стандартных условиях гипоксии до 43,3 ± 4,3 минут, что на 125 % больше аналогичного показателя у животных, получавших плацебо. Анализ фармакодинамики комбинации препаратов по T. Chou показал аддитивный тип взаимодействия, что позволяет снижать дозы компонентов при их сочетанном применении в 3,0–7,5 раз.

**Ключевые слова:** тимохинон; мелатонин; гипоксия; гиперкапния; мыши.

**Введение.** Гипоксия считается одной из ключевых проблем в патологии. Кислородное голодание тканей и активизация процессов перекисного окисления липидов – типичные механизмы, характерные для множества заболеваний, особенно тех, что начинаются остро, протекают остро и сопровождаются усилением деструктивных изменений в органах. Для коррекции этих нарушений очевидна необходимость использования цитопротекторов и средств, восстанавливающих метаболизм [1–2]. Тимохинон (2-изопропил-5-метил-1,4-бензохинон) – один из компонентов семян черного тмина (*Nigella sativa*), по литературным данным обладает цитопротекторным, антиоксидантным и антиишемическим действием при экспериментальной гипоксии [3–4]. Также перспективным цитопротектором является мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин), основной функцией которого считается влияние на циркадные ритмы, он также оказывает терморегулирующее, иммуномодулирующее, стресслимитирующее и антиоксидантное действие [5–8]. Для повышения антигипоксической активности и эффективности тимохинона и мелатонина был изучен результат фармакодинамического взаимодействия при их совместном применении.

**Цель исследования:** определить антигипоксическую активность и эффективность комбинации тимохинона с мелатонином, установить характер их взаимодействия на модели гипоксии-гиперкапнии у мышей.

**Материалы и методы.** Исследование проведено в экспериментальной лаборатории кафедры фармакологии БГМУ в соответствии с нормами биомедицинской этики и правилами гуманного обращения с животными. Антигипоксическое действие субстанций и их комбинации исследовали в опытах на 95 мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 32–38 г на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме [9]. За 40 мин до эксперимента животным однократно внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл / 10 г массы тела вводили суспензии изучаемых веществ: тимохинона в дозах 5, 10 и 30 мг/кг и / или мелатонина 10, 20 и 50 мг/кг. В комбинаторное сочетание включали дозы препаратов в изомолярном соотношении (1 : 1) – 10 мг/кг тимохинона + 10 мг/кг мелатонина и 20 мг/кг тимохинона + 20 мг/кг мелатонина. В качестве препарата сравнения использовали эталонный антигипоксант бемитил в максимальных эффективных на этой модели дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг [9]. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. Для оценки антигипоксического действия мышей по одному помещали в стеклянные контейнеры объемом 270 см<sup>3</sup>, герметичность контролировали путем погружения в сосуд с водой. Время жизни животных регистрировали секундомером. Использовали тимохинон чистотой ≥97,5 %, поставляемый Acros Organics (США), лот №A0460598, субстанцию бемитила производства Института физико-органической химии Национальной

Академии наук Беларуси и препарат таблеток мелатонина выпуска ООО «Рубикон».

Полученные данные обрабатывали с применением параметрического анализа по критерию Дункана для множественных парных сравнений. Различия между группами признавали достоверными при  $p < 0,05$ . Анализ фармакодинамического взаимодействия тимохинона и мелатонина выполнен по методике T.Chou [10] посредством специально разработанного интерактивного алгоритма с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel [9; 11]. Методом регрессионного анализа определяли эффективные дозы ( $ED_{16}$ – $ED_{84}$ ) индивидуальных субстанций и их комбинаторного сочетания. Рассчитывали индекс снижения дозы (DRI) компонентов комбинации по формуле  $DRI = (D_x)_j/(D)_j$ , где  $(D)_j$  – доза агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении;  $(D_x)_j$  – доза агента, оказывающая аналогичный эффект при индивидуальном применении. Значение DRI показывает, во сколько раз можно снизить дозу каждого компонента в синергичной комбинации для достижения эффекта, сопоставимого

представляли графически в виде рассчитанной путем регрессионного анализа зависимости «доза-эффект» индивидуальных субстанций и их комбинации.

**Результаты и обсуждение.** При помещении мышей в герметично закрытые емкости по мере потребления кислорода концентрация его в воздухе сосуда и организме снижается, а количество углекислого газа, наоборот, возрастает – развивается гипоксическая гипоксия с гиперкардией. Первые признаки гипоксии у животных, получавших плацебо, появлялись в среднем на 15-й минуте нахождения в закрытом контейнере. Вначале отмечали нарушение типичного поведения, отдельные признаки возбуждения, увеличение частоты дыхательных движений. В дальнейшем последовательно появлялись: нарушения равновесия и координации, утрачивалась способность удерживать позу, затем регистрировали отдельные агональные вдохи, остановку дыхания и гибель. Средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы в условиях гиперкардиической гипоксии в герметическом объеме 270 см<sup>3</sup> составляла 19,3 ± 0,9 минут (табл. 1 и рис. 1).

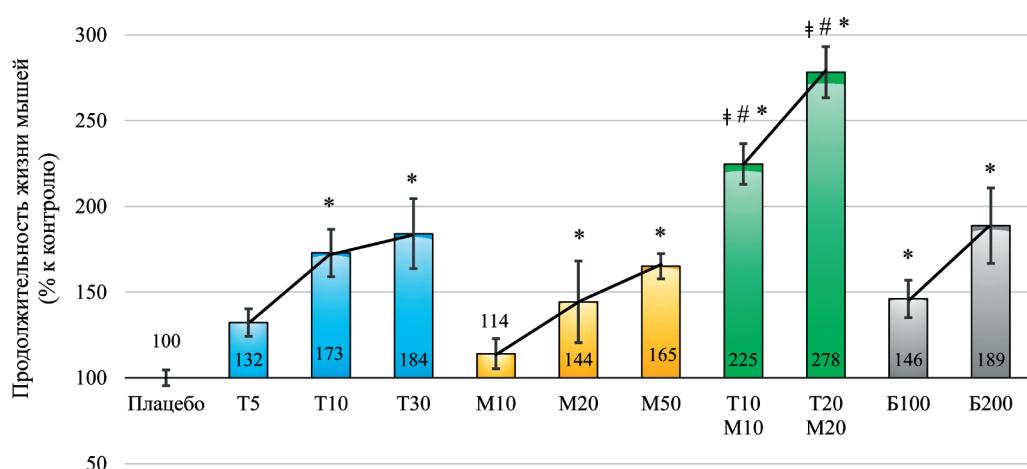
Таблица 1 – Влияние тимохинона, мелатонина и их комбинаторного сочетания на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкардией ( $M \pm m$ )

Субстанции	Дозы и их соотношение, мг/кг	n	Продолжительность жизни, минут	Продолжительность жизни, в % к контролю
Плацебо	–	21	19,3 ± 0,9	100 ± 4,6
Бемитил	100	12	28,2 ± 1,7*	146,1 ± 8,8*
	200	6	36,4 ± 4,6*	188,7 ± 23,7*
Тимохинон	5	8	25,5 ± 2,1	132,2 ± 11,0
	10	12	33,2 ± 2,8*	172,8 ± 14,5*
	30	6	35,5 ± 4,4*	184,1 ± 23,0*
Мелатонин	10	6	22,0 ± 1,4	114,1 ± 7,3
	20	6	27,8 ± 2,3*	144,3 ± 11,8*
	50	6	31,8 ± 2,9*	165,1 ± 14,9*
Комбинация тимохинона и мелатонина в соотношении 1 : 1	10 : 10	6	43,3 ± 4,3* #‡	224,7 ± 22,5* #‡
	20 : 20	6	53,7 ± 2,8* #‡	278,3 ± 14,3* #‡

Примечания: \*  $p < 0,05$  в сравнении с плацебо по критерию Дункана; #  $p < 0,05$  по отношению индивидуальному эффекту той же дозы тимохинона, критерий Дункана; ‡  $p < 0,05$  по отношению индивидуальному эффекту той же дозы мелатонина, критерий Дункана.

с индивидуальным действием компонента. Взаимодействие оценивали по величине комбинаторного индекса  $CI = ((D)_{jl}/(D_x)_{jl}) + ((D)_{j2}/(D_x)_{j2})$ . Значения CI трактовали в соответствии со шкалой Chou-Talalay [3–5]:  $CI < 1,0$  – синергизм, усиливающийся при уменьшении этого показателя;  $CI > 1,0$  – антагонизм. Результаты

эталонный препарат бемитил при однократном внутрибрюшинном введении оказывал дозозависимое антигипоксическое действие. Типичные поведенческие проявления кислородного голодания у мышей, получавших бемитил в дозе 200 мг/кг, появлялись значительно позже, а средняя продолжи-



Примечания: *T* – тимохинон, *M* – мелатонин, *Б* – препарат сравнения бемитил, приведены дозы, мг/кг;  
 $* p < 0,05$  в сравнении с плацебо по критерию Дункана;  $\# p < 0,05$  по отношению индивидуальному эффекту той же дозы тимохинона, критерий Дункана;  $\ddagger p < 0,05$  по отношению индивидуальному эффекту той же дозы мелатонина, критерий Дункан.

Рис. 1. Влияние тимохинаона, мелатонина и их комбинаций на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкапнией ( $M \pm m$ )

тельность жизни на 95 % больше в сравнении с группой контроля ( $36,4 \pm 4,6$  минут,  $p = 0,00004$  по критерию Дункана). После назначения препарата в дозе 100 мг/кг время жизни мышей увеличилось до  $28,2 \pm 1,7$  минут ( $p = 0,030$ ), что на 46,1 % больше, чем в группе контроля.

Мелатонин оказывал выраженное дозозависимое антигипоксическое действие в тех же условиях. При введении препарата в дозе 10 мг/кг выявлена тенденция к увеличению резистентности животных к гиперкапнической гипоксии, продолжительность жизни  $22,0 \pm 1,4$  минуты (на 14,1 % больше плацебо,  $p = 0,444$ ). Мелатонин в дозе 20 мг/кг продлевал жизнь мышей при гипоксии на 44,3 % ( $27,8 \pm 2,3$  минут,  $p = 0,034$ ), а в дозе 50 мг/кг на 65,1 % ( $31,8 \pm 2,9$  минут,  $p = 0,002$ ).

Тимохинон, испытанный на модели гиперкапнической гипоксии у мышей в диапазоне доз от 5 до 30 мг/кг, оказывал дозозависимое антигипоксическое действие, которое при дозах 10 и 30 мг/кг приближалось к эффекту 200 мг/кг бемитила. После однократного внутрибрюшинного введения тимохинаона в дозе 5 мг/кг выявлена тенденция к увеличению резистентности животных к гиперкапнической гипоксии, продолжительность жизни  $25,5 \pm 2,1$  минуты ( $p = 0,276$ ), что на 36,6 % больше, чем в группе контроля. Тимохинон в дозе 10 мг/кг продлевал жизнь мышей в ус-

ловиях гипоксии на 75,9 % ( $32,8 \pm 5,5$  минуты,  $p = 0,008$ ), а в дозе 30 мг/кг на 90,2 % ( $35,5 \pm 4,4$  минут,  $p = 0,002$ ) в тех же условиях.

При совместном применении тимохинаона и мелатонина в дозах, соответственно, 10 + 10 мг/кг продолжительность жизни мышей составила  $43,3 \pm 4,3$  минуты, что на 124,7 % больше показателя группы, получавшей плацебо ( $p = 0,000018$ ), что существенно больше эффекта аналогичных доз тимохинаона ( $p = 0,00027$ ), мелатонина ( $p = 0,013$ ) и максимальной испытанной дозы 200 мг/кг эталонного антигипоксанта бемитила ( $p = 0,005$ ). Комбинаторное сочетание 20 мг/кг тимохинаона и 20 мг/кг мелатонина в аналогичных условиях увеличивало время жизни животных до  $53,7 \pm 2,8$  минут (на 178,3 % больше контроля,  $p = 0,000017$ ), и также существенно превышает эффект аналогичных доз тимохинаона ( $p = 0,000032$ ), мелатонина ( $p = 0,000052$ ) и эталонного антигипоксанта бемитила в дозе 200 мг/кг ( $p = 0,00003$ ).

Максимальное зарегистрированное в нашем исследовании значение продолжительности жизни – 61 минута у двух мышей, получавших комбинацию тимохинаона и мелатонина по 20 мг/кг, и одного животного, получившего комбинацию в дозах по 10 мг/кг (316 % по отношению к контролю). Эта величина применена в расчетах в качестве предельного показателя эффекта ( $E_{99}$ ) при моделировании

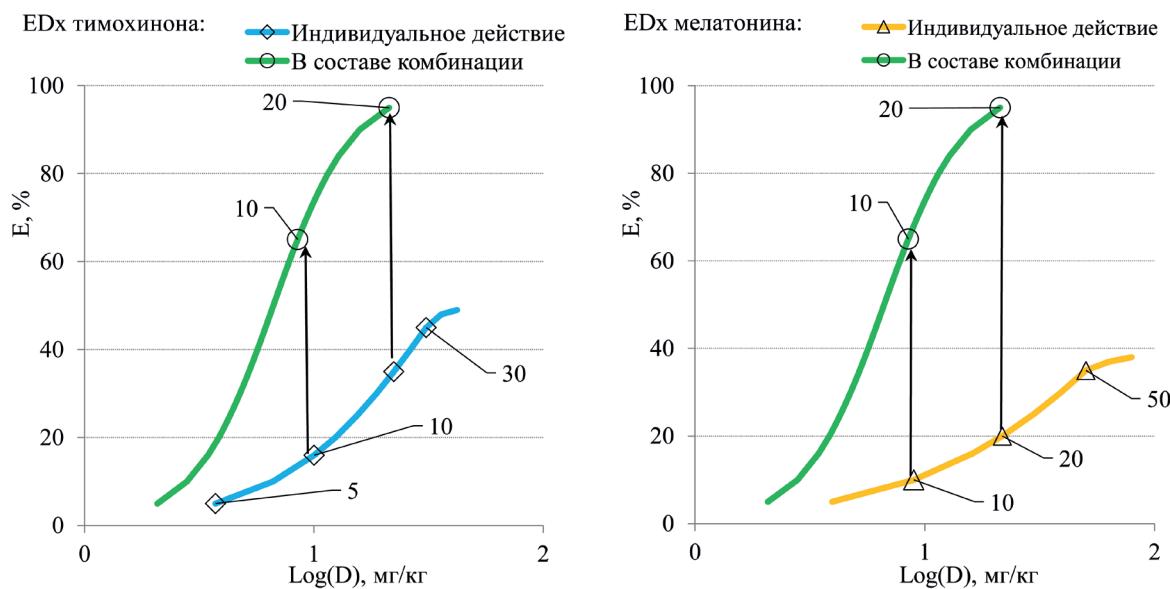


Рис. 2. Кривые доза-антигипоксический эффект при индивидуальном действии тимохинона и мелатонина и в составе комбинаторного сочетания в соотношении 1 : 1 на модели острой гипоксии-гиперкапнии у мышей

фармакодинамического взаимодействия компонентов комбинации. Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения продолжительности жизни животных, получавших в отдельности тимохинон, мелатонин либо их комбинаторное сочетание, кривые доза-эффект в лог-нормальных координатах представлены на рис. 2.

**Примечания.** На рассчитанных методом регрессионного анализа функциях отмечены полученные в эксперименте данные. Восходящими стрелками соединены показатели эффекта на фармакодинамических кривых в координатах доза-эффект, достигнутые при изолированном применении определенных доз тимохинона либо мелатонина, и тех же доз в составе комбинаций.

Среднеэффективная доза ( $ED_{50}$ ) тимохиона, рассчитанная посредством регрессионного анализа закономерности доза-эффект, составила 49 мг/кг,  $ED_{50}$  мелатонина по антигипоксическому эффекту 99 мг/кг. Математический анализ по T.Chou [10] результатов совместного действия тимохиона и мелатонина показал, что благодаря аддитивному характеру взаимодействия компонентов комбинации доза тимохиона в составе комбинаторного сочетания в 3,0–7,5 раз ниже дозы, вызывающей аналогичное индивидуальное действие,  $ED_{50}$  тимохиона в комбинации 6,7 мг/кг, в 7,4 раза меньше, чем при отдельном применении. Рас-

четное значение  $ED_{50}$  мелатонина в составе комбинации 6,7 мг/кг, что в 14,8 раз меньше этого показателя при индивидуальном применении. Среднеэффективные дозы комбинации тимохиона и мелатонина в соотношении 1 : 1 проявляли сильный синергизм,  $CI_{50} = 0,25 \pm 0,09$ .

Фармакодинамический синергизм тимохиона и мелатонина по антигипоксическому эффекту, обнаруженный в настоящем исследовании, важен для понимания механизмов действия компонентов. В качестве вероятного механизма антигипоксического действия тимохиона при ишемии-реперфузии почек называют ингибицию клеточного фактора индуцируемого гипоксией альфа (HIF-1 $\alpha$ ) и последующее снижение NF- $\kappa$ B, факторов хемотаксиса моноцитов (CCL-2) и клеточной адгезии VCAM-1 [12]. Как полагают, в результате подавляются воспалительные и свободнорадикальные процессы при реперфузии ишемизированного органа. В других исследованиях тимохинон инициировал убиквитин-зависимую деградацию HIF-1 $\alpha$  протеасомами в клетках опухоли почек [13] и поджелудочной железы [14]. Существует мнение, что HIF-1 $\alpha$  один из основных генов, координирующих в условиях гипоксии переход к анаэробному метаболизму для производства клеточной энергии [15]. HIF-1 $\alpha$  индуцирует различные гликолитические ферменты и переносчики глюкозы, такие



как альдолаза-А и пируваткиназа-М, которые помогают клеткам эффективно вырабатывать энергию при гипоксии. Помимо увеличения экспрессии этих ферментов, HIF-1 снижает потребление кислорода митохондриями за счет активации пируватдегидрогеназной киназы-I и остановки цикла трикарбоновых кислот. Также одним из возможных механизмов цитопротекторного и антигипоксического действия тимохинона считают повышение биологической активности Sirt1 и Nrf2 – ключевых регуляторов клеточного ответа на стресс, окислительный стресс и воспаление [16–17]. Мелатонин в свою очередь способствует синтезу и экспрессии белков как Sirt1, так и Nrf2 [18–19]. Индукция Sirt1 и Nrf2 мелатонином может быть связана с активацией регулируемого мелатонином часового фактора транскрипции Bmal1, было показано, что это управляет транскрипцией генов, кодирующих Sirt1 и Nrf2 [20]. Bmal1 также поддерживает активность Sirt1, индуцируя никотинамидфосфорибозилтрансферазу [21]. В некоторых тканях передача сигнала мелатонином через его рецептор плазматической мембранные MT1 повышает регуляцию мРНК Bmal1 [22]. В отличие от многих антиоксидантов, эффект которых воспроизводится только в тестах *in vitro*, мелатонин влияет на продукцию активных форм кислорода и показатели перекисного окисления в тканях животных и человека

и при системном введении. В частности, мелатонин в дозе 20 мг/кг внутрибрюшинно уменьшал гибель нейронов у мышей на модели травматического повреждения головного мозга, церебропротективное действие препарата коррелировало с его влиянием на показатели окислительного стресса в тканях [8].

Таким образом, сильный фармакодинамический синергизм комбинации тимохинона с мелатонином, обнаруженный в нашем исследовании, может объясняться плейотропным действием компонентов на ключевые регуляторы клеточного ответа в отношении гипоксии. При этом, в то время как тимохинон усиливает биологическую активность как Sirt1, так и Nrf2, мелатонин усиливает экспрессию их белков.

**Заключение.** Тимохинон и мелатонин при однократном раздельном применении продлевают жизнь мышей при гипоксии. Рассчитанная ED<sub>50</sub> мелатонина – 99 мг/кг, ED<sub>50</sub> тимохинона – 49 мг/кг. Тимохинон в сочетании с мелатонином в соотношении 1 : 1 демонстрирует синергичное повышение активности и эффективности, активность мелатонина увеличивается в 14,8 раз, тимохинона – в 7,4 раз. При совместном назначении 10 мг/кг тимохинона и 10 мг/кг мелатонина антигипоксический эффект значительно превосходит результат действия отдельных компонентов в максимальных испытанных дозах.

### Список цитируемых источников

1. Oliynyk, S., The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance / S. Oliynyk, S. Oh // Biomol Ther (Seoul). – 2012. – Vol. 20. – № 5. – P. 446–456.
2. Лызиков, А.Н. Лекарственные средства нового фармакологического класса – антигипоксанты (актопротекторы) : учеб.-метод. пособие / А.Н. Лызиков, А.Э. Питкевич; под ред. Э.С. Питкевича. – Гомель : Гомельский государственный медицинский университет, 2007. – 132 с.
3. Thymoquinone and its pharmacological perspective: A review / S. Tabassum [et al.] // Pharmacological Research – Modern Chinese Medicine. – 2021. – Vol. 1. – 100020.
4. Darakhshan, S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. / S. Darakhshan, A.B. Pour, A.H. Colagar, S.Sisakhtnezhad. // Pharmacological Research. – 2015. – Vol. – 95–96. – P. 138-158.
5. Reiter, R.J. Melatonin: Exceeding Expectations / R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano // Physiology. – 2014. – № 29. – P. 325–333.
6. Antioxidant Actions of Melatonin: A Systematic Review of Animal Studies / K. K. A. C. Monteiro [et al.] // Antioxidants. – 2024. – № 13. – P. 439–450.
7. Melatonin and Health: Insights of Melatonin Action, Biological Functions, and Associated Disorders / S. B. Ahmad [et al.] // Cell Mol Neurobiol. – 2023. – № 43(6). – P. 303–307.
8. Neurological Enhancement Effects of Melatonin against Brain Injury-Induced Oxidative Stress, Neuroinflammation, and Neurodegeneration via AMPK/CREB Signaling / Shafiq Ur Rehman [et al.] // Cells. – 2019. – N 8. – 760.
9. Ращекевич, О.С., Антигипоксический эффект комбинации бемитила и тимохинона в условиях гиперкапнической гипоксии / О.С. Ращекевич, А.В. Волчек // Известия Национальной академии наук Беларусь. Серия медицинских наук. – 2024. – Том 21(4). – С. 345–352. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-345-352>
10. Chou, T-Ch. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies / T-Ch. Chou. // Pharmacological reviews. – 2006. – Vol. 58. – P. 621–681.

11. Волчек, А.В. Противовоспалительные свойства комбинации мелоксикама и N-ацетил L-пролина. / А.В. Волчек, Б.В. Дубовик // Известия Национальной академии наук Беларусь. Серия медицинских наук. – 2021. – Том 18(2). – С. 220–227. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-220-227>
12. Thymoquinone ameliorates acute kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion / H. Ashour [et al.] // Int. J. Morphol. – 2021. – Vol. 39, № 2. – P. 469–476.
13. Thymoquinone Selectively Kills Hypoxic Renal Cancer Cells by Suppressing HIF-1 $\alpha$ -Mediated Glycolysis / Y.M. Lee [et al.] // Int J Mol Sci. – 2019. – Vol. 20, № 5. – Article ID 1092.
14. Thymoquinone Promotes Pancreatic Cancer Cell Death and Reduction of Tumor Size through Combined Inhibition of Histone Deacetylation and Induction of Histone Acetylation / D. Relles [et al.] // Adv Prev Med. – 2016. – Article ID 1407840.
15. Ziello, J.E., Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia / J.E. Ziello, I.S. Jovin, Y.Huang // Yale J Biol Med. – 2007. – Vol. 80, № 2. – P. 51–60.
16. Talebi, M., Biological and therapeutic activities of thymoquinone: Focus on the Nrf2 signaling pathway / M. Talebi, T. Farkhondeh, S. Samarghandian // Phytother Res. – 2021. – Vol. 35. – P. 1739–1753.
17. Therapeutic impact of thymoquinone to alleviate ischemic brain injury via Nrf2/HO-1 pathway / N. Amin [et al.] // Expert Opin Ther Targets. – 2021. – Vol. 25. – P. 597–612.
18. Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of SIRT1 / L. Yu [et al.] // J Pineal Res. – 2014. – Vol. 57. – P. 228–238.
19. Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating NRF2 and inhibiting ER stress / J. Fang [et al.] // Aging (Albany NY). – 2018. – Vol. 10. – P. 2954–2972.
20. Sun, Q., Mechanism of circadian regulation of the NRF2/ARE pathway in renal ischemia-reperfusion / Q. Sun, C. Zeng, L. Du, C. Dong // Exp Ther Med. – 2021. – Vol. 21. – Article ID 190.
21. Circadian control of the NAD $^{+}$  salvage pathway by CLOCK-SIRT1 / Y. Nakahata [et al.] // Science. – 2009. – Vol. 324. – P. 654–657.
22. Melatonin prevents senescence of canine adipose-derived mesenchymal stem cells through activating NRF2 and inhibiting ER stress / J. Fang [et al.] // Aging (Albany NY). – 2018. – Vol. 10. – P. 2954–2972.

#### PHARMACODYNAMIC SYNERGISM OF THYMOQUINONE AND MELATONIN IN RESPIRATORY HYPOXIA

**O.S. Rashkevich, A.U. Vauchok**

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

The antihypoxic effect of a combination of thymoquinone and melatonin after single intraperitoneal injection was studied in a model of hypercapnic hypoxia in a hermetic volume in mice. The average effective dose of thymoquinone in this model, calculated by regression analysis, was 49 mg/kg, the average effective dose of melatonin was 99 mg/kg. As part of a combination in a ratio of 1:1, the activity of the compounds increases significantly, the ED<sub>50</sub> of thymoquinone decreases to 6,7 mg/kg, the same indicator for melatonin also becomes 6,7 mg/kg. Administration of a combination of 10 mg/kg of thymoquinone and 10 mg/kg of melatonin to mice leads to an increase in their lifespan under standard hypoxic conditions up to 43,3 ± 4,3 minutes, which is 125 % more than in animals receiving placebo. An analysis of the pharmacodynamics of the combination of drugs according to T.Chou showed an additive type of interaction, which makes it possible to reduce the doses of the components in their combined use by 3,0–7,5 times.

**Key words:** thymoquinone; melatonin; hypoxia; hypercapnia; mice.