

О. С. Рашкевич, П. С. Селицкая, Л. В. Бутько, А. В. Волчек

ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКИЙ СИНЕРГИЗМ БЕМИТИЛА И МЕЛАТОНИНА ПРИ РЕСПИРАТОРНОЙ ГИПОКСИИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»,
Минск, Республика Беларусь

Изучено антигипоксическое действие комбинации бемитила и мелатонина при однократном внутривентральном введении на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме у мышей. Рассчитанная методом регрессионного анализа среднееффективная доза бемитила на данной модели составила 210 мг/кг, среднееффективная доза мелатонина 99 мг/кг. В составе комбинаторного сочетания в соотношении 5:1 активность соединений существенно возрастает, ED_{50} бемитила снижается до 85 мг/кг, аналогичный показатель мелатонина становится 14,7 мг/кг. Назначение комбинации 100 мг/кг бемитила и 20 мг/кг мелатонина мышам приводит к увеличению продолжительности их жизни в стандартных условиях гипоксии до $46 \pm 4,3$ минут, что на 138,5 % больше аналогичного показателя животных, получавших плацебо. Анализ фармакодинамики комбинации препаратов по Т. Чоу показал аддитивный тип взаимодействия, что позволяет снижать дозы компонентов при их сочетанном применении в 2,0–6,7 раз. Ввиду отсутствия видовой специфичности действия бемитила и мелатонина их синергичная комбинация может быть интересна для применения у человека.

Ключевые слова: бемитил, мелатонин, гипоксия, гиперкапния, мыши.

O. S. Rashkevich, P. S. Selitskaya, L. V. Butko, A. U. Vauchok

PHARMACODYNAMIC SYNERGISM OF BEMETHYL AND MELATONIN IN RESPIRATORY HYPOXIA

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The antihypoxic effect of a combination of bemethyl 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 bemethyl in this model, calculated by regression analysis, was 210 mg/kg, the average effective dose of melatonin was 99 mg/kg. As part of a combination in a ratio of 5:1, the activity of the compounds increases significantly, the ED_{50} of bemethyl decreases to 85 mg/kg, the same indicator for melatonin becomes 14.7 mg/kg. Administration of a combination of 100 mg/kg of bemethyl and 20 mg/kg of melatonin to mice leads to an increase in their lifespan under standard hypoxic conditions up to 46 ± 4.3 minutes, which is 138.5 % 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 2.0–6.7 times.

Key words: bemethyl, melatonin, hypoxia, hypercapnia, mice.

Экстремальные состояния человека – стресс, травмы, шок, воздействие высоких и низких температур, гравитационные перегрузки, экстренные и плановые операции, радиационное поражение и физическое истощение – имеют общий патогенетический механизм: кислородное голодание клеток и активацию процессов свободно-радикального окисления [1]. Основываясь на этом, В. М. Виноградовым была выдвинута гипотеза о возможности создания средств с антигипоксическим действием – универсальных лекарств для коррекции подобных нарушений. Бемитил (2-этил-

тиобензимидазола гидробромид) – первый представитель класса антигипоксантов и актопротекторов, разработан на кафедре фармакологии Военно-медицинской академии имени С. М. Кирова (РФ) с целью решения специфических задач военной медицины. Основные направления его использования включают профилактику утомления при длительных физических нагрузках, в том числе высокогорную гипоксию, что особенно актуально для военнослужащих, выполняющих интенсивные учебно-боевые задачи в горных и пустынных районах, а также в условиях срочных вертикальных

перемещений. Фармакологическую защиту и сохранение эффективности операторской деятельности в сложных условиях, таких как высокая температура, повышенная влажность и загазованность (например, в танковых и авиационных бригадах), а также во время длительных космических полетов и автономного плавания. Поддержание работоспособности при комбинированном воздействии гипоксии, перегревания, высокой влажности, вибрации, физических или эмоциональных перегрузок и других неблагоприятных факторов. Бемитил в качестве актопротектора применялся военными в Афганистане, использовался участниками ликвидации последствий аварии в Чернобыле и землетрясения в Армении. Клинические исследования подтвердили его эффективность при различных гипоксических и ишемических нарушениях: стрессе, острой и подострой дыхательной недостаточности, инсультах, инфарктах и шоке различной этиологии, а также при травматических хирургических вмешательствах на органах грудной и брюшной полостей и гипоксии плода [2].

Одной из важных задач современной фармакологии является изыскание способов повышения фармакологической активности и эффективности имеющихся лекарственных средств, что, в частности, может быть достигнуто путем использования синергичных комбинаций. В нашем исследовании с применением стандартизированных апробированных методов [3–5] было изучено фармакодинамическое взаимодействие известного антигипоксанта и актопротектора бемитила с мелатонином. Основной функцией мелатонина (N-ацетил-5-метокситриптамиин) считается влияние на циркадные ритмы, однако он также обладает терморегулирующим, иммуномодулирующим, стресслимитирующим и антиоксидантным эффектами и может рассматриваться в качестве перспективного цитопротектора в том числе при гипоксии [6–9].

Цель исследования: определить антигипоксическую активность и эффективность комбинации мелатонина с бемитилом, 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 75 мышах-самцах линии C57Bl/6 массой 32–38 г на модели гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме [5]. За 40 мин до эксперимента животным однократно внутривенно в объеме 0,1 мл / 10 г массы тела вводили суспензии изучаемых веществ: бемитила

в дозах 50, 100 и 200 мг/кг и / или мелатонина 10, 20 и 50 мг/кг. В комбинаторное сочетание включали дозы препаратов, каждая из которых увеличивала продолжительность жизни животных при раздельном ведении приблизительно на 50 % по отношению к контролю – 100 мг/кг бемитила и 20 мг/кг мелатонина. Были изучены и меньшие дозы комбинации, 50 мг/кг бемитила + 10 мг/кг мелатонина, сохраняя при этом соотношение компонентов 5 к 1. Контрольные животные получали эквивалентный объем растворителя. Для оценки антигипоксического действия, мышей по одному помещали в стеклянные контейнеры объемом 270 см³, герметичность контролировали путем погружения в сосуд с водой. Время жизни животных регистрировали секундомером. Использовали 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 бемитила и мелатонина выполнен по методике T. Chou [3] посредством специально разработанного интерактивного алгоритма с использованием вычислительных возможностей компьютерной программы Microsoft Excel [4–5]. 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 $DRI = (D_x)_j / (D_x)_j$, где $(D)_j$ – доза агента, оказывающая эффект определенной силы при комбинированном применении; $(Dx)_j$ – 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 с индивидуальным действием компонента. Взаимодействие оценивали по величине комбинаторного индекса $CI = ((D)_{j1} / (D_x)_{j1}) + ((D)_{j2} / (D_x)_{j2})$. 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 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,

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

Субстанции	Дозы и их соотношение, мг/кг	n	Продолжительность жизни, минут	Продолжительность жизни, в % к контролю
Плацебо	–	21	$19,3 \pm 0,9$	$100 \pm 4,6$
Бемитил	50	6	$23,2 \pm 2,7$	$120,1 \pm 13,8$
	100	12	$28,2 \pm 1,7^*$	$146,1 \pm 8,8^*$
	200	6	$36,4 \pm 4,6^*$	$188,7 \pm 23,7^*$
Мелатонин	10	6	$22,0 \pm 1,4$	$114,1 \pm 7,3$
	20	6	$27,8 \pm 2,3^*$	$144,3 \pm 11,8^*$
	50	6	$31,8 \pm 2,9^*$	$165,1 \pm 14,9^*$
Комбинация бемитила и мелатонина в соотношении 5 : 1	50 : 10	6	$24,8 \pm 2,1$	$128,8 \pm 10,1$
	100 : 20	6	$46,0 \pm 4,3^{*#}$	$238,5 \pm 22,0^{*#}$

Примечания: * – $p < 0,05$ в сравнении с плацебо по критерию Дункана;

– $p < 0,05$ по отношению индивидуальному эффекту той же дозы бемитила, критерий Дункана.

возрастает – развивается гипоксическая гипоксия с гиперкапнией. 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 гиперкапнической гипоксии в герметическом объеме 270 см³ составляла $19,3 \pm 0,9$ минут (табл. 1 и рис. 1).

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 продолжительность жизни была на 95 % больше в сравнении с группой контроля ($36,4 \pm 4,6$ минут, $p = 0,00004$ по критерию Дункана). После назначе-

ния 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. В дозе 50 мг/кг бемитил обнаруживал тенденцию к повышению устойчивости животных к гипоксии, продолжительность жизни составила $23,2 \pm 2,7$ минуты (на 20,1 % больше плацебо, $p = 0,304$).

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 была $22,0 \pm 1,4$ 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, $p = 0,002$).

При совместном применении бемитила и мелатонина в дозах, соответственно, 50+10 мг/кг продолжительность жизни мышей составила $24,8 \pm 2,1$ минуты, что на 28,8 % больше показателя группы, получавшей плацебо ($p = 0,156$). Комбинаторное сочетание 100 мг/кг бемитила и 20 мг/кг мелатонина в аналогичных условиях увеличивало

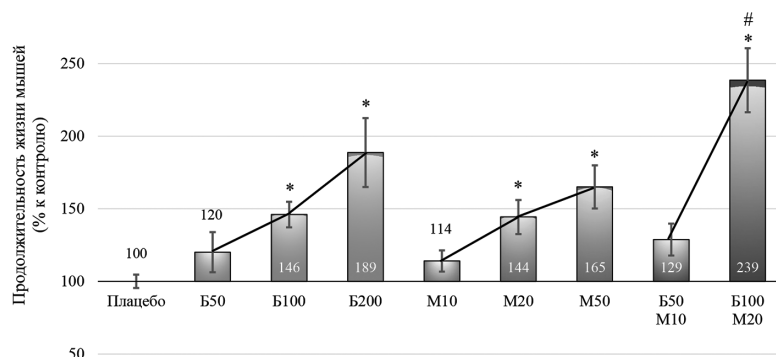


Рис. 1. Влияние бемитила, мелатонина и их комбинаций на продолжительность жизни мышей в условиях острой гипоксии с гиперкапнией ($M \pm m$)

Примечания: Б – бемитил, М – мелатонин, приведены дозы, мг/кг; * – $p < 0,05$ в сравнении с плацебо по критерию Дункана; # – $p < 0,05$ по отношению индивидуальному эффекту той же дозы бемитила по критерию Дункана.

время жизни животных до $46,0 \pm 4,3$ минут (на 138,5 % дольше контроля, $p = 0,000018$), что существенно превышает эффект аналогичных доз бемитила ($p = 0,008$) и мелатонина ($p = 0,000036$).

Максимальное зарегистрированное в нашем исследовании значение продолжительности жизни было 61 минут у мыши, получившей 100 мг/кг бемитила и 20 мг/кг мелатонина (316 % по отношению к контролю). Эта величина применена в расчетах в качестве предельного показателя эффекта (ED_{99}) при моделировании фармакодинамического взаимодействия компонентов комбинации. Регрессионный анализ показал дозозависимый характер изменения продолжительности жизни животных, получавших в отдельности бемитил, мелатонин либо их комбинаторное сочетание, кривые доза-эффект в лог-нормальных координатах представлены на рис. 2.

Среднеэффективная доза (ED_{50}) бемитила, рассчитанная посредством регрессионного анализа закономерности доза-эффект, составила 210 мг/кг, ED_{50} мелатонина по антигипоксическому эффекту 99 мг/кг. Математический анализ по Т. Chou [3] результатов совместного действия бемитила и мелатонина показал, что благодаря аддитивному характеру взаимодействия компонентов комбинации, доза бемитила в составе комбинаторного сочетания в 2,0–2,5 раз ниже дозы, вызывающей аналогичное индивидуальное действие, ED_{50} в комбинации в 2,5 раза меньше, чем при отдельном применении. Расчетное значение ED_{50} мелатонина в составе комбинации было 14,7 мг/кг, что в 6,7 раз меньше этого показателя при индивидуальном применении. Среднеэффективные дозы комбинации бемитила и мелатонина в соотношении 5:1 проявляли синергизм, $CI_{50} = 0,64 \pm 0,003$.

Фармакодинамический синергизм бемитила и мелатонина по антигипоксическому эффекту, обнаруженный в настоящем исследовании, важен для понимания возможных механизмов действия компонентов. Антигипоксическое действие бемитила, как полагают, обусловлено увеличением экспрессии короткоживущих возобновляемых ферментов глюконеогенеза и окислительного фосфорилирования [10]. В результате активации глюкозо-лактатного и глюкозо-аланинового циклов бемитилом утилизируются азотистые продукты распада и лактат, происходит ресинтез глюкозы, повышается образование АТФ [10]. Все эти изменения способствуют выработке энергии в анаэробных условиях и повышению устойчивости клеток к гипоксии. Действие мелатонина на организм реализует через MT1 и MT2 подтипы его рецепторов, локализующихся в различных тканях – головном мозге, сердце, эндотелии сосудов и т.д. [6, 7]. Механизм антиоксидантного действия мелатонина основан на том, что он, являясь донором электронов и перехватчиком активных форм кислорода, способен воздействовать на высокоактивные гидроксильные радикалы, образующие при перекисном окислении липидов. Также мелатонин оказывает косвенное влияние на активность таких ферментов как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза, а также на клеточную систему антиоксидантной защиты, повышая уровень глутатионредуктазы [8]. 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

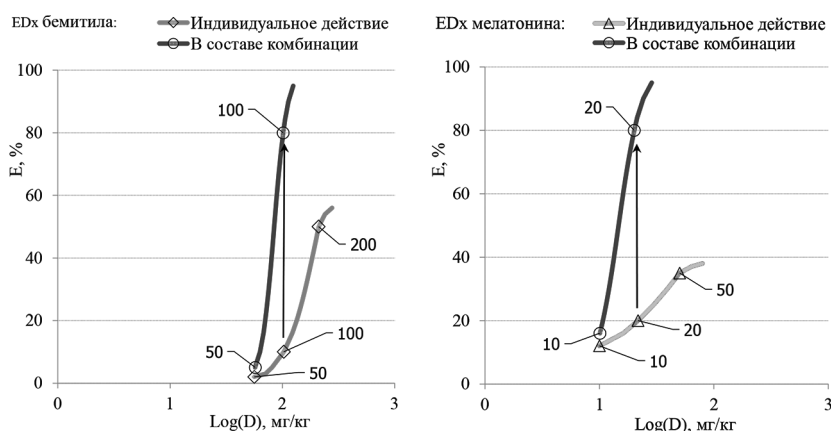


Рис. 2. Кривые доза-антигипоксический эффект при индивидуальном действии бемитила и мелатонина и в составе комбинаторного сочетания в соотношении 5:1 на модели острой гипоксии-гиперкапнии у мышей

П р и м е ч а н и я. 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 бемитила либо мелатонина, и тех же доз в составе комбинаций.

уменьшал гибель нейронов у мышей на модели травматического повреждения головного мозга, церебропротективное действие препарата коррелировало с его влиянием на показатели окислительного стресса в тканях [9].

Установленное в настоящем исследовании одностороннее индивидуальное действие бемитила и мелатонина, выражающееся в повышении устойчивости экспериментальных животных к гиперкапнической гипоксии, и их синергизм в комбинации свидетельствуют о том, что исследованные антигипоксиканты имеют различные фармакодинамические мишени действия и взаимно-независимые пути трансдукции сигнала. Следует отметить, что не представляется возможным заранее предсказать результат фармакодинамического взаимодействия соединений на основе их известных или предполагаемых механизмов действия. В связи с этим перспективные комбинации необходимо изучать экспериментально с применением адекватной методологии.

Заключение. Мелатонин и бемитил при однократном раздельном применении продлевают жизнь мышей при гипоксии. Расчетная ED_{50} мелатонина – 99 мг/кг, ED_{50} бемитила – 210 мг/кг. Бемитил в сочетании с мелатонином в соотношении 5:1 демонстрируют синергичное увеличение активности и эффективности, активность мелатонина увеличивается в 6,7 раз, бемитила – в 2,5 раза. Антигипоксическая эффективность комбинации бемитил 100 мг/кг + мелатонин 20 мг/кг значительно превосходит результат действия максимальных испытанных доз отдельных компонентов. Ввиду отсутствия по литературным данным видовой специфичности действия бемитила [2, 10] и мелатонина [6–9], их синергичная комбинация может быть интересна для применения у человека.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Виноградов, В. М. Антигипоксиканты – важный шаг на пути разработки фармакологии энергетического обмена / В. М. Виноградов, А. В. Смирнов // Антигипоксиканты и актопротекторы: итоги и перспективы. – СПб, 1994. – С. 23.
2. Лычиков, А. Н. Лекарственные средства нового фармакологического класса – антигипоксиканты (актопротекторы): учеб.-метод. пособие / А. Н. Лычиков, А. Э. Питкевич; под ред. Э. С. Питкевича. – Гомель: УО «Гомельский государственный медицинский университет», 2007. – 132 с.
3. 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.
4. Волчек, А. В. Противовоспалительные свойства комбинации мелоксикама и N-ацетил L-пролина. / А. В. Волчек, Б. В. Дубовик. // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2021. – Том 18(2). – С. 220–227. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-220-227/>

5. Рашкевич, О. С., Волчек А. В. Антигипоксический эффект комбинации бемитила и тимохинона в условиях гиперкапнической гипоксии. Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2024;21(4): 345–352. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-345-352>

6. Reiter, R. J. Melatonin: Exceeding Expectations / R. J. Reiter, D. X. Tan, A. Galano // Physiology. – 2014. – № 29. – P. 325–333.

7. Antioxidant Actions of Melatonin: A Systematic Review of Animal Studies / K. K. A. C. Monteiro [et al.] // Antioxidants. – 2024. – № 13. – P. 439–450.

8. 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.

9. 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.

10. Oliynyk S., Oh S. The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance. Biomol Ther (Seoul). 2012 Sep;20(5): 446–56. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.5.446.

References

1. Vinogradov, V. M. Antigipoksanty – vazhnyy shag na puti razrabotki farmakologii energeticheskogo obmena / V. M. Vinogradov, A. V. Smirnov // Antigipoksanty i aktoprotektory: itogi i perspektivy. – SPb, 1994. – S. 23.

2. Lyzikov, A. N. Lekarstvennye sredstva novogo farmakologicheskogo klassa – antigipoksanty (aktoprotektory): ucheb.-metod. posobie / A. N. Lyzikov, A. E. Pitkevich; pod red. E. S. Pitkevicha. – Gomel': UO «Gomel'skij gosudarstvennyy medicinskij universitet», 2007. – 132 s.

3. 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.

4. Volchek, A. V. Protivovospalitel'nye svoystva kombinatsii meloksikama i N-acetil L-prolina. / A. V. Volchek, B. V. Dubovik. // Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya medicinskih nauk. – 2021. – Tom 18(2). – S. 220–227. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2021-18-2-220-227>.

5. Rashkevich O. S., Volchek A. V. Antigipoksicheskiy effekt kombinatsii bemitila i timohinona v usloviyakh giperkapnicheskoy gipoksii. Izvestiya Nacional'noj akademii nauk Belarusi. Seriya medicinskih nauk. 2024;21(4):345–352. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2024-21-4-345-352>.

6. Reiter, R. J. Melatonin: Exceeding Expectations / R. J. Reiter, D. X. Tan, A. Galano // Physiology. – 2014. – № 29. – P. 325–333.

7. Antioxidant Actions of Melatonin: A Systematic Review of Animal Studies / K. K. A. C. Monteiro [et al.] // Antioxidants. – 2024. – № 13. – P. 439–450.

8. 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.

9. 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.

10. Oliynyk, S., Oh, S. The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance. Biomol Ther (Seoul). 2012 Sep;20(5): 446–56. doi: 10.4062/biomolther.2012.20.5.446.

Поступила 11.11.2025 г.