

**ISSN 2075-3810 (print)**  
**ISSN 2075-3829 (online)**

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна**

# **Біофізичний Вісник**

**Випуск 50**

**Заснований 1998 р.**

**Харків 2023**

**Біофізичний вісник** публікує наукові статті, короткі повідомлення та огляди, які містять оригінальні результати розв'язання фізико-математичних та інженерно-технічних проблем, що відносяться до біологічних систем рівня організації, методами експериментальної і теоретичної фізики, математичного та комп'ютерного моделювання. Журнал виходить 2 рази на рік.

**Свідоцтво про державну реєстрацію:** KB № 11007 від 17.02.2006.

**ISSN 2075-3829** (Online)

**ISSN 2075-3810** (Print)

**Біофізичний вісник** є фаховим виданням України категорії «Б» у галузях наук: 10 Природничі науки за спеціальностями 104 Фізика та астрономія, 105 Прикладна фізика та наноматеріали; 09 Біологія за спеціальністю 091 Біологія; 16 Хімічна та біоінженерія за спеціальністю 163 Біомедична інженерія (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1643 від 28.12.2019).

Всі статті проходять внутрішнє та зовнішнє подвійне сліпе рецензування.

Номер затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 23 від 25.12.2023).

Журнал має Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

#### **Головний редактор**

**Косевич М. В.**, д.ф.-м.н., с.н.с., п.н.с., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна – головний редактор

#### **Заступник головного редактора**

**Катрич В. О.**, д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

#### **Відповідальний секретар**

**Берест В. П.**, д.ф.-м.н., доцент, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

#### **Члени редколегії**

**Аврунін О. Г.**, д.т.н., професор, Харківський національний університет радіоелектроніки, Харків, Україна

**Andrushchenko V.**, PhD, Senior Scientist, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic

**Bednarczyk P.**, Dr. hab., Assistant professor, Warsaw University of Life Sciences, Poland

**Binder H.**, PhD, Dr. rer. nat. habil., Universität Leipzig, Germany

**Burkina V.**, PhD, Researcher, University of South Bohemia in Czech Republic

**Вашенко О. В.**, д.ф.-м.н., с.н.с., п.н.с., Інститут скінтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

**Горбенко Г. П.**, д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

**Гордієнко О. І.**, д.ф.-м.н., професор, зав. відділу, Інститут проблем кріобіології та кріомедицини Національної академії наук України, Харків, Україна

**Гуцол Т. Д.**, д.т.н., професор, Поліський національний університет, Житомир, Україна

**Довбешко Г. І.**, д.ф.-м.н., професор, Інститут фізики Національної академії наук України, Київ, Україна

**Domanov Ye. A.**, PhD, Head of Skin Biophysics Group, L'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

**Zamaratskaia G.**, PhD, Associate Professor, Senior Lecturer, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

**Жолос О. В.**, д.б.н., професор, зав. каф., Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

**Злепко С. М.**, д.т.н., професор, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна

**Кавок Н. С.**, к.б.н., с.н.с., Інститут скінтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

**Карачевцев В. О.**, д.ф.-м.н., професор, член-кор. НАН України, Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б. І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна

**Корнелюк О. І.**, д.б.н., професор, член-кор. НАН України, зав. відділу, Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ, Україна

**Лисецький Л. М.**, д.ф.-м.н., професор, п.н.с., Інститут скінтиляційних матеріалів Національної академії наук України, Харків, Україна

**Ніколов М. О.**, к.т.н., с.н.с., доцент, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

**Павлов С. В.**, д.т.н., професор, Вінницький національний технічний університет, Вінниця, Україна

**Попов А. О.**, к.т.н., доцент, доцент, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського», Київ, Україна

**Reva I.**, PhD, Dr. Hab., Investigador Principal, Departamento de Quimica, Universidade de Coimbra, Portugal

**Rutkauskas D.**, Ph.D., Senior Researcher, Centre for Physical Sciences and Technology, Vilnius, Lithuania

**Соляник Г. І.**, д.ф.-м.н., професор, Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.С. Кавецького Національної академії наук України, Київ, Україна

**Степаньян С. Г.**, д.ф.-м.н., с.н.с., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна Національної академії наук України, Харків, Україна

**Štys D.**, Prof. RNDr. CSc. Institute of Complex Systems FFPW, University of South Bohemia, Czech Republic

**Ткачук Р. А.**, д.т.н., професор, Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Тернопіль, Україна

**Томашевський Р. С.**, д.т.н., професор, директор навчально-наукового інституту, Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Харків, Україна

**Трусова В. М.**, д.ф.-м.н., професор, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, Україна

**Feldman Y.**, Prof., PhD (Phys. & Math.), Director Dielectric Spectroscopy LAB, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

**Шестопалова Г. В.**, д.ф.-м.н., професор, Інститут радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова Національної академії наук України, Харків, Україна

**Шуба Я. М.**, д. б. н., професор, академік НАН України, зав. відділу, Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, Україна;

**Yakovenko S.**, PhD, Associate Professor, West Virginia University, School of Medicine, USA

**Горобченко О. О.**, к.ф.-м.н., доцент, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна – *технічний редактор*

**Жигалова Н. М.**, інженер I кат., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна – *технічний секретар*

**Біофізичний вісник індексується:** Національною бібліотекою України імені В. І. Вернадського; Scopus; Directory of Open Access Journals (DOAJ); Бібліографічною базою даних WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE).

#### **Адреса редколегії та видавництва:**

Кафедра молекулярної і медичної біофізики,  
Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем,  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,  
майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

**Tel:** +38-057-707-55-76

**E-mail:** biophys-visnyk@karazin.ua

**Web-page:** <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

© Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, 2023

© В. В. Гурмач, В. Р. Караушу, З. С. Клестова, В. П. Берест, Ю. І. Прилуцький,  
рисунок C<sub>60</sub> фулеренів у модельному клітинному середовищі на першій сторінці обкладинки, 2023

**ISSN 2075-3810 (print)**  
**ISSN 2075-3829 (online)**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE  
V. N. Karazin Kharkiv National University

# Biophysical Bulletin

**Issue 50**

Founded in 1998

**Kharkiv 2023**

**Biophysical Bulletin** publishes original scientific articles, short communications and reviews dealing with physical, mathematical, and engineering problems pertaining to biological systems and solved by methods of experimental and theoretical physics, mathematical modeling and computer simulation. The journal is published twice a year.

**Certificate of state registration:** KB № 11007 of 17.02.2006.

**ISSN 2075-3829** (Online)

**ISSN 2075-3810** (Print)

All manuscripts are double blind peer-reviewed by at least two reviewers.

Approved for publication by the Academic Council of V. N. Karazin Kharkiv National University (December 25, 2023, Protocol No. 23).

Biophysical Bulletin has Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

#### *Editor-in-Chief*

**M. V. Kosevich**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), B.I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

#### *Deputy Editor-in-Chief*

**V. A. Katrich**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

#### *Executive Secretary*

**V. P. Berest**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

#### *Editorial Board*

**O. G. Avrunin**, Dr. Sci. (Engin.), Prof., Kharkiv National University of Radio Electronics, Kharkiv, Ukraine

**V. Andrushchenko**, PhD, Senior Scientist, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Czech Academy of Science, Prague, Czech Republic

**P. Bednarczyk**, Dr. hab., Assistant professor, Warsaw University of Life Sciences, Poland

**H. Binder**, PhD, Dr. rer. nat. habil., Universität Leipzig, Germany

**V. Burkina**, PhD, researcher, University of South Bohemia, Czech Republic

**O. V. Vashchenko**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Institute for Scintillation Materials of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**G. P. Gorbenko**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

**O. I. Gordienko**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., head Department, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**T. D. Hutsol**, Dr. Sci. (Engin.), Prof., Polissia National University, Zhytomyr, Ukraine

**G. I. Dovbeshko**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**Ye. A. Domanov**, PhD, Head of Skin Biophysics Group, L'Oréal Research & Innovation, Aulnay-sous-Bois, France

**G. Zamaratskaia**, PhD, Associate Professor, Senior Lecturer, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

**A. V. Zholos**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., head Chair, Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

**S. M. Zlepko**, Dr. Sci. (Engin.), Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia, Ukraine

**N. S. Kavok**, PhD (Biol.), senior researcher, Institute for Scintillation Materials of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**V. A. Karachevtsev**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**A. I. Kornelyuk**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, Institute of Molecular Biology and Genetics of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

**L. N. Lysetskyi**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., leading research fellow, Institute for Scintillation Materials of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**N. A. Nikolov**, PhD (Engin.), senior researcher, associate professor, National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute", Kiev, Ukraine

**S. V. Pavlov**, Dr. Sci. (Engin.), Vinnytsia National Technical University, Vinnytsia, Ukraine

**A. A. Popov**, PhD (Engin.), Associate professor, National Technical University of Ukraine "Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute" disabled, Kyiv, Ukraine

**I. Reva**, PhD, Dr. Hab., Investigator Principal, Departamento de Quimica, Universidade de Coimbra, Portugal

**Danielis Rutkauskas**, PhD, Senior Researcher, Centre for Physical Sciences and Technology, Vilnius, Lithuania

**G. I. Solyanik**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, Kiev, Ukraine, Ukraine

**S. G. Stepanian**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), B. I. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**D. Štys**, Prof. RNDr., CSc., Institute of Complex Systems FFPW, University of South Bohemia, Czech Republic

**R. A. Tkachuk**, Dr. Sci. (Engin.), Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

**R. S. Tomashevskiy**, Prof. Dr. Sci. (Engin.), Director of the Educational and Scientific Institute, National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute" disabled, Kharkiv, Ukraine

**V. M. Trusova**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine, V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

**Y. Feldman**, PhD (Phys. & Math.), Prof., Director Dielectric Spectroscopy LAB, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

**A. V. Shestopalova**, Dr. Sci. (Phys. & Math.), Prof., O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

**Y. M. Shuba**, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of the National Academy of Sciences of Ukraine, Head of the Department, Bogomolets Institute of Physiology disabled of The National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

**S. Yakovenko**, PhD, Associate Professor, West Virginia University, School of Medicine, USA

**O. A. Gorobchenko**, PhD (Phys. & Math.), V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine – *Technical Editor*

**N. M. Zhyhalova**, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine – *Technical Secretary*

**Biophysical Bulletin is indexed in:** Vernadsky National Library of Ukraine; Scopus; Directory of Open Access Journals (DOAJ); WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE)

#### **Editorial Office and Publisher:**

Department of Molecular and Medical Biophysics  
School of Radio Physics, Biomedical Electronics and Computer Systems  
V. N. Karazin Kharkiv National University,  
4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

**Tel:** +38-057-707-55-76

**E-mail:** biophys-visnyk@karazin.ua

**Web-page:** <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

© V. N. Karazin Kharkiv National University, 2023

© V. V. Hurmach, V. R. Karaushu, Z. S. Klestova, V.P. Berest, Yu. I. Prylutskyy, the picture of the C<sub>60</sub> fullerenes in a model cell medium on the first page of the cover, 2023

## ЗМІСТ

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

**Iu. Riabenko, S. Shulga, K. Beloshenko**

Calculation of the relative permittivity of Rhodamine 6G using the quantum mechanical method 7–16

## БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

**В. В. Гурмач, В. Р. Караушу, З. С. Клестова, В. П. Берест,  
Ю. І. Прилуцький**Проникність наночастинок C<sub>60</sub> фулерену крізь модельну ліпідну оболонку коронавірусу та їх протикоронавірусна дія в системі *in ovo* 17–24

## МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

**О. V. Vashchenko, О. А. Ruban, I. V. Zupanets, P. V. Vashchenko,  
О. I. Ivaniuk**

Kinetic biopharmaceutical studies of a new paracetamol–glucosamine analgetic drug 25–35

## МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

**A. Nyporko, O. Tsymbalyuk, I. Voiteshenko, S. Starosyla, M. Protopopov,  
V. Bdzhola**

New promising agents against COPD and asthma among the amides of 1-oxo-3-phenyl-isochroman-6-carboxylic acid 36–47

**CONTENTS****MOLECULAR BIOPHYSICS**

- Iu. Riabenko, S. Shulga, K. Beloshenko**  
Calculation of the relative permittivity of Rhodamine 6G using the quantum mechanical method 7–19

**CELL BIOPHYSICS**

- V. V. Hurmach, V. R. Karaushu, Z. S. Klestova, V. P. Berest, Yu. I. Prylutsky**  
C<sub>60</sub> fullerene nanoparticles permeability through the model lipid envelope of coronavirus and their anticoronavirus effect in the *in ovo* system 17–24

**METHODS OF BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS**

- O. V. Vashchenko, O. A. Ruban, I. V. Zupanets, P. V. Vashchenko, O. I. Ivaniuk**  
Kinetic biopharmaceutical studies of a new paracetamol–glucosamine analgetic drug 25–35

**MOLECULAR BIOPHYSICS**

- A. Nyporko, O. Tsymbalyuk, I. Voiteshenko, S. Starosyla, M. Protopopov, V. Bdzhol**  
New promising agents against COPD and asthma among the amides of 1-oxo-3-phenyl-isochroman-6-carboxylic acid 36–47

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-01>

UDC 543.4:577.32:577.344:535.015:57.087

## CALCULATION OF THE RELATIVE PERMITTIVITY OF RHODAMINE 6G USING THE QUANTUM MECHANICAL METHOD

Iuliia Riabenko<sup>1,2,\*</sup> , Sergey Shulga<sup>1</sup> , Konstantin Beloshenko<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> School of radiophysics, biomedical electronics and computer systems,

V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022 Ukraine

<sup>2</sup> Institute of Physical Chemistry, Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller University Jena, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Germany

\*Corresponding author: [jriabenko@karazin.ua](mailto:jriabenko@karazin.ua), [iuliia.riabenko@uni-jena.de](mailto:iuliia.riabenko@uni-jena.de)

Submitted July 17, 2023; Revised September 29, 2023;

Accepted November 9, 2023

**Background:** The article describes a method for calculating the permittivity of organic molecules in quantum mechanics using the well-studied Rhodamine 6G molecule as an example. The study of optical properties of large organic molecules requires not only experimental data but also the use of calculations obtained both analytically and numerically.

**Objectives:** Methods for calculating permittivity as phenomenological characteristics of a sample are to be tested on well-studied molecules to be further applied to more complex nonlinear structures. However, the integral changes need to be approximated in the wave functions of large molecules.

**Material and methods:** The numerical simulations in MATLAB were carried out to be compared with the data from Gaussian 09, which are accurate for such small molecules as Rhodamine 6G. MATLAB calculated permittivity values for the frequency domains corresponding to absorption and fluorescence based on the Fermi golden rule. Hence, any molecule can be represented as a composite quantum mechanical system. Meanwhile, Gaussian 09 used the DFT method to determine permittivity.

**Results:** The Fermi golden rule can be applied due to the representation of the molecule as a complex quantum mechanical system. The proposed numerical methods minimize error by using the Dirac delta function. According to our hypothesis, the sum of the wave function of a particle in a potential well and a particle in a ring equals the wave function of the entire system, thus making it possible to study large molecules. As a result of the calculation for two wavelengths of 337 and 573 nm, the permittivity results calculated using the proposed method in MATLAB are 2.98 and 6.27, respectively. Gaussian 09 calculated the same parameters at 2.85 and 6.23.

**Conclusion:** The resulting datasets show a high degree of correlation. Therefore, the research hypothesis has been confirmed. The selected method also proved efficient, hence the enhancement of luminescence can be achieved by changing the relaxation time of the excited state. Plasmonic nanostructures with predetermined properties will controllably enhance the resulting field by the square of the superposition modulus of their near-field. Consequently, conditions for highly coherent radiation with high intensity and polarization can be predicted and calculated before an experiment is carried out.

**KEYWORDS:** DFT method; Fermi golden rule; Dirac delta function; luminescence; Rhodamine 6G; wave function.

**In cites:** Riabenko Iu, Shulga S, Beloshenko K. Calculation of the relative permittivity of Rhodamine 6G using the quantum mechanical method. Biophysical Bulletin. 2023;50:7–16. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-01>

**Open Access.** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

© Riabenko Iu., Shulga S., Beloshenko K., 2023.

Dyes include polyatomic molecules with an intense absorption band in the visible and ultraviolet regions of the spectrum [1]. Benzene, pyridine or other rings constitute the structural basis of such molecules [2]. Interest in such structures is dictated by the phenomenon of luminescence [3]. Rhodamine 6G is one of the most well-studied dyes ( $\lambda \approx 0.5 - 0.7 \mu m$ ) characterized by a high stimulated emission cross-section [4]. Although most Rhodamine dyes used to be studied in solutions [5–7], recently there has been a growing interest in the electronic properties of dyes at the interfaces between media [8–10]. Recent studies present calculations of the optical response in dyes based on the ab initio molecular dynamics [11, 12] at varying emission wavelengths, line widths, intensities, and lifetime [13, 14]. The DFT method established the eigenvalue of a molecule's molecular Hamiltonian and stationary states in a molecule [15, 16]. However, this method is inapplicable to permittivity calculations as it does not comprehensively understand wave functions corresponding to the relevant stationary states. The current research aims to describe the spectra of laser radiation within a model based on quantum mechanics and to verify the suggested model.

The structure of energy levels in the molecules of dyes can be represented by singlet  $S$  and triplet  $T$  electronic states [17]. The energy levels of the Rhodamine 6G dye are shown in Fig. 2. The energy state between vibrational levels is about  $0,19 eV$ , while between rotational levels, it reaches around  $0,01 eV$  [19]. The broadening of the electronic energy level in the solution is larger than the energy gap between the rotational levels. For this reason, spin selection criteria determine possible combinations of transitions between/within electronic states at rotational levels, while the electronic states represent virtually continuous zones of permitted energy [20].

When light is absorbed, the molecule transitions from a lower energy level  $S_0$  to an excited level  $S_1$ . Due to a rapid thermal relaxation ( $\tau r \sim 10^{-12} s$ ) [3] at the energy level  $S_1$ , electrons move to lower vibrational levels. A spontaneous transition to the level  $S_0$  is associated with fluorescent radiation. Thus, in dye solutions, optical excitation can lead to a population inversion from the upper vibrational levels of the  $S_0$  band to the lower ones of the  $S_1$  band. Amplification of light is observed at the frequencies corresponding to fluorescence. The resulting data can be used in order to calculate luminescence of Rhodamine 6G. Further enhancing luminescence can be accomplished with high-quality resonant systems [21–22], widely used in nanophotonics.

## MATERIAL AND METHODS

The large size of the dye molecule [23] determines the high value of the matrix element of the dipole moment  $\mu$  of the molecule [24], since the electrons involved in the absorption of light are "smeared" almost over the entire volume of the molecule. Consequently, the absorption coefficient  $k \sim |\mu|^2$  [25] can also reach values which determine significant absorption of light in solutions even at a low carrier concentration, which gives the solution a color that supplements the absorption spectrum. But it also implies that an increase in fluorescence is associated with permitted dipole transitions  $S_1 \rightarrow S_0$ .

The description of permittivity is usually [26] associated with point dipoles subject to forced oscillations under the action of an external wave field. In this case, dissipation of energy leads to oscillation damping when the external field is removed. Thus, in a system consisting of point dipoles, the incident radiation can be absorbed, scattered. It can also have no interaction with the medium (in this case, the material is transparent in a given spectral domain) [27]. If the incident wave is represented as a monochromatic plane wave propagating along the  $z$ -axis, it can be expressed with the following equation:

$$\vec{E}_{in}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{i(kz - \omega t)}, \quad (1)$$

where  $\vec{E}_{in}(\vec{r}, t)$  is the incident field;  $k$  stands for the wave vector;  $\omega$  refers to incident frequency. Polarization of the medium is expressed as follows:

$$\vec{d}(\vec{r}, t) = \varepsilon_0 \chi(\omega) \vec{E}(\vec{r}, t), \quad (2)$$

where  $\vec{d}(\vec{r}, t)$  is the dipole moment of the medium-related unit of volume and  $\chi(\omega)$  refers to medium polarizability.

Then the field formed by point dipoles can be described as:

$$\vec{E}_M(\vec{r}, t) \sim -z \frac{\partial \vec{d}}{\partial t} = i\omega z \vec{d}(\vec{r}, t). \quad (3)$$

The resulting field in the medium can be described with the following equation:

$$\vec{E}_{total} = \vec{E}(\vec{r}, t) + \vec{E}_m(\vec{r}, t). \quad (4)$$

In classical electrodynamics, the presence of a group of dipoles causes a phase shift in a field located within a medium or at its boundary. The phase, as mentioned earlier, shift leads to both a weaker field (a change in the modulus of the  $E_{total}$  vector) and a change in the direction of wave propagation (phase of the  $E_{total}$  vector). A specific case of such a shift to be cited is a mirror that changes the phase of the reflected wave by  $\pi$ .

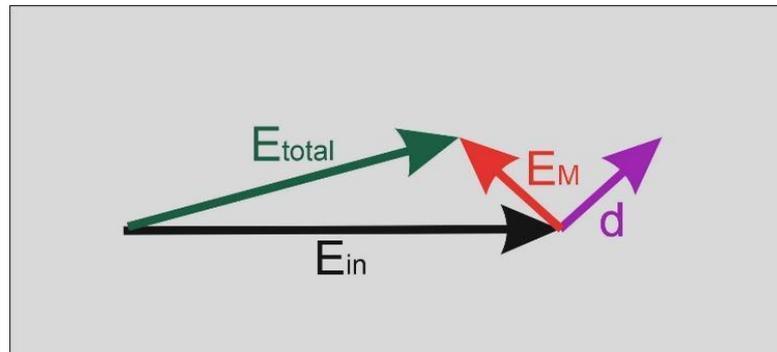


Fig. 1. Vector diagram of field superposition in the sample.

If viewed as a system in quantum mechanics, a molecule [18] can be viewed as a point dipole changing its dipole moment over time. Taking into account this difference, we cannot average the polarizability of the medium over time. Consequently, we have to consider the molecule's lifetime in the excited state and its nonradiative relaxation time. The calculations in this article were based on dried samples. Thus, the mechanism of fluorescence connected with permittivity is modeled as follows:

1. Luminescence in Rhodamine 6G is represented as a two-level system;
2. Dipole moment operators are established for each transition, while the wave functions are presented for the particle in the ring [28];
3. The level population is calculated with the help of the Fermi Golden Rule [29];
4. The equation is used to calculate the permittivity [30];
5. Calculations using MATLAB are carried out [31];
6. The results are compared to those obtained using Gaussian 09 [32].

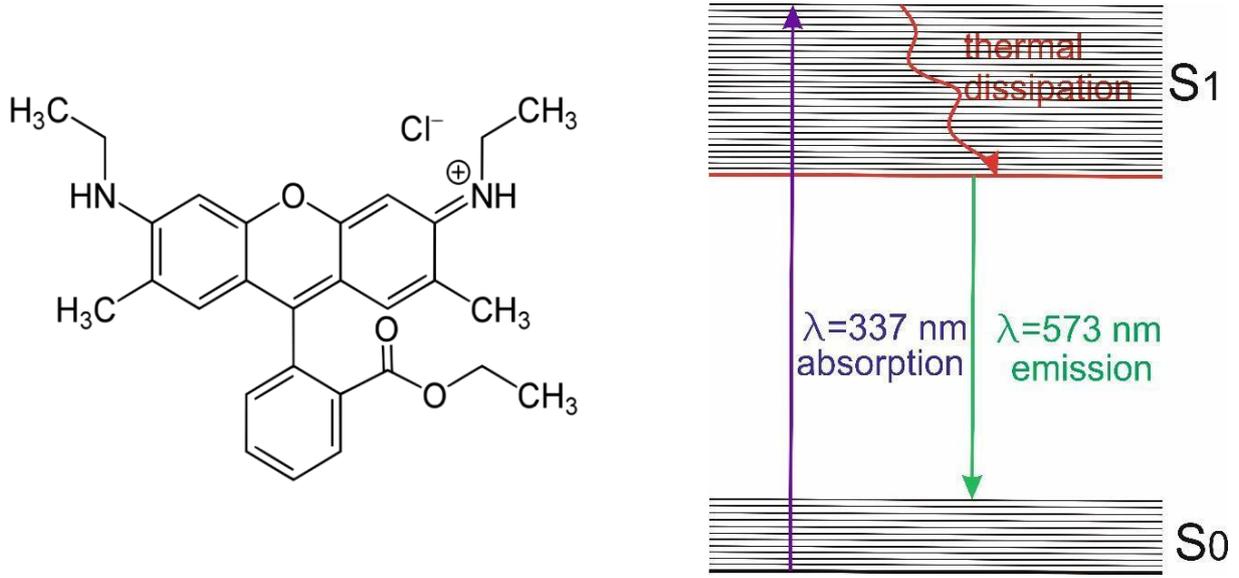


Fig. 2. Yablonsky diagram of Rhodamine 6G energy levels and its structural formula.

The permittivity of the medium, which takes into account quantum mechanical effects, can be represented as [33]:

$$\tilde{\epsilon} = 1 + \frac{32\pi^2 N \epsilon_0}{3\hbar} \sum_j \frac{|d_{ji}|^2}{\omega_{ji}^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} = 1 + \frac{32\pi^2 \epsilon_0}{3\hbar} \left[ \frac{N_1 |d_{13}|^2}{\omega_{13}^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} + \frac{N_2 |d_{21}|^2}{\omega_{21}^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} + \frac{N_3 |d_{32}|^2}{\omega_{32}^2 - \omega^2 + i\Gamma\omega} \right], \quad (5)$$

where  $N$  is the population of the level,  $\epsilon_0$  — vacuum permittivity,  $\hbar$  — Planck's constant,  $d_{ji}$  — transition dipole moment operator and  $\omega_{ij}$  — frequency of transition from level  $i$  to level  $j$ .

In the first approximation, we observe transition to excited vibrational sublevels of the  $S_1$  level with the dipole moment  $d_{13}$  and the transition frequency  $\omega_{13}$ . It is followed by nonradiative relaxation to the lower vibrational sublevels of the  $S_1$  level with the dipole moment  $d_{32}$  and the transition frequency  $\omega_{32}$ . The last radiative transition goes from the lower vibrational sublevels of the  $S_1$  level to the upper vibrational sublevels of the  $S_0$  level having the dipole moment  $d_{21}$  and the transition frequency  $\omega_{12}$ . Meanwhile, energy levels broadening depends on the lifetimes in states  $i$  and  $j$  [34]:

$$\Gamma = \frac{1}{2} \left[ \frac{1}{\tau_i} + \frac{1}{\tau_j} \right]. \quad (6)$$

The dipole moment operator is calculated based on the volume of the entire molecule [35]:

$$d_{ji} = \langle \varphi_i | = \int_V \varphi_j (ea + \vec{D}_s) \varphi_i, \quad (7)$$

where  $a$  is the radius of the excited electron orbit and  $D_s$  is the dipole moment of the structure.

The wave functions of a particle in a ring can be expressed as follows [28]:

$$\varphi_n = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{in\frac{\vec{r}}{R}}. \quad (8)$$

$R$ -ring radius,  $n = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$  quantum numbers of state

$$\vec{d} = ea + \vec{D}_s. \quad (9)$$

The  $N_1, N_2, N_3$  3 levels population is calculated according to the Fermi golden rule [33]:

$$W^{(1)} = \frac{2\pi}{\hbar} |V_{ij}|^2 \delta(\omega_j - \omega_i - \omega), \quad (10)$$

$$N_i = W^{(1)}\tau_i, \quad (11)$$

where  $\delta(\omega_j - \omega_i - \omega)$  — Dirac delta distribution and  $\hat{V}_{ij}$  — the element which can be calculated as:

$$\hat{V}_{ij} = \frac{1}{2} \vec{E} \vec{d}. \quad (12)$$

The non-radiative transition shown as the third term in the formula (5) of permittivity, taking into account thermal radiation, is represented as follows [36]:

$$\varepsilon = \frac{2}{\varepsilon_0} \frac{cu}{|E|^2}, \quad (13)$$

where  $u$  is the electromagnetic density of thermal radiation [33]:

$$u = \frac{\hbar\omega^3}{\pi^2 c^3} \frac{1}{e^{\frac{\hbar\omega}{kT}} - 1}. \quad (14)$$

Where  $k$  is Boltzmann's constant,  $T$  — thermodynamic temperature,  $E$  — electric field tension can be determined as a superposition of the electric field formed by the nucleus and the rest of electrons that are not involved in the radiationless transition.

## RESULT AND DISCUSSION

Permittivity was calculated in MATLAB. The input data are given in Table 1.

Table 1. Initial data [37] for the numerical calculation of the permittivity

Radius of the Rhodamine 6G ring (from Gaussian 09)	$9102 \times 10^{-9}$ m
Lifetime on the ground vibration S0 level	$10 \times 10^{-6}$ s
Lifetime on the S1 ground vibration energy level	$10 \times 10^{-8}$ s
Lifetime on the S1 higher vibration energy level	$10 \times 10^{-9}$ s
Absorption frequency	$5.589 \times 10^{15}$ s <sup>-1</sup>
Emission frequency	$3.287 \times 10^{15}$ s <sup>-1</sup>
Nonradiation transition frequency	$2.302 \times 10^{15}$ s <sup>-1</sup>

The data obtained due to simulation in MATLAB were verified through calculations in Gaussian 09. The interactive chemical structure model of the molecule is shown in Fig. 2 (from Avogadro 1.1.1). The calculation was carried out using a method based on the Hartree-Fock theory without imposing symmetry restrictions but with the DFT functional, which is an economical method for including electron correlations with a three-parameter density functional — Becke3LYP (B3LYP). The OPT method optimized the geometry using the basis set of cc-pVDZ orbitals. The DFT method calculated the molecular properties of the Rhodamine 6G, and then the Clausius-Mossotti approximation was used to determine the permittivity [38, 39]. The calculated values of permittivity obtained in MATLAB and calculated in Gaussian 09 are shown in Table 2.

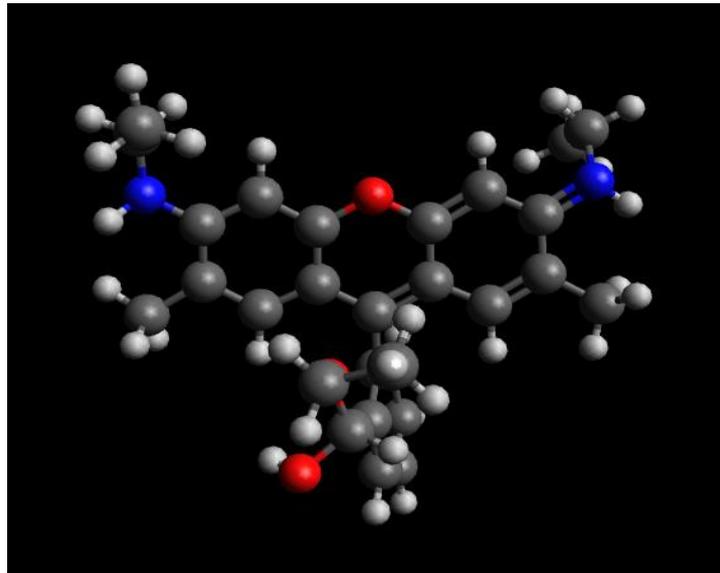


Fig. 3. The interactive chemical structure model of the Rhodamine 6G molecule.

Table 2. Calculation of permittivity for two wavelengths

	<b>B3YP/cc-pVDZ</b>	<b>MATLAB</b>
$\epsilon$	2.85 ( $\lambda=337$ nm)	2.89 ( $\lambda=337$ nm)
$\epsilon$	6.23( $\lambda=573$ nm)	6.27( $\lambda=573$ nm)

Permittivity generally depends on the lifetime of the molecule in an excited state as well as on the nonradiative transition time. Therefore, it is possible to change permittivity by modifying the relaxation time of the excited state. This approach is used to enhance the luminescence by amplifying the local field. In this case, the analysis of formula (10) provides a better understanding of the conditions where the maximum enhancement is reached. In this case, the phase difference between the incident wave and the electric dipole can be divided by  $m\pi$ . Such enhancement applies to plasmonic nanostructures. These structures transform the incident field into a surface wave [40], where the electric field vector is parallel to the medium polarizability vector. The resulting field is amplified in proportion to the square of the near-field superposition modulus, which allows controlling enhancement of the dye luminescence by creating a predetermined near field.

Currently, numerical calculations are based on RCWA and FDTD methods which involve permittivity convolution [41, 42]. A supercomputer is often required in order to perform the

calculations needed. In the case of large and complex biophysical systems, it is impossible to perform calculations in nonlinear media where the permittivity depends on the exciting electric field. Primarily, it is due to the fact that the presence of float point accuracy [43] leads to the Gibbs phenomenon [44]. On the other hand, the dynamic matrix of permittivity cannot be used in convolution [32]. Thus, a robust method is required in order to avoid the difficulties described above when performing calculations for complex nonlinear biophysical systems. The new and original method proposed can be applied for this purpose. It considers a quantum mechanical system in the electrodynamic approximation where a discrete continuum of energy interacts with a continuous one.

## CONCLUSION

The paper presents a numerical method for permittivity calculation using a quantum mechanics approach. The representation of a molecule as a complex quantum mechanical system makes it possible to use the Fermi golden rule. The wave function of such a system for a small molecule of Rhodamine 6G can be presented as the sum of the wave functions for a particle in a potential well and a particle in a ring. The wave equation for large molecules is difficult to solve with Gaussian 09 as it requires much time and a supercomputer. Sometimes, it is not possible at all due to the accumulation of system errors when calculating the electronic structure of atoms. Applying the proposed numerical methods minimizes the error due to the Dirac delta function. Therefore, numerical simulation for MATLAB is relevant to establish the optical characteristics of molecules of any size. In this paper, the data obtained from MATLAB were compared with the calculations carried out in Gaussian 09. As a result of the calculation for two wavelengths of 337 and 573 nm, the permittivity results calculated using the proposed method in MATLAB are 2.98 and 6.27, respectively. Gaussian 09 calculated the same parameters at 2.85 and 6.23. The resulting data show a high degree of correspondence, which confirms that representation of the quantum mechanics properties of Rhodamine 6G is functional and the selected numerical method is valid.

These results are important for studying more complex molecules, such as toxins or nucleic acids. Integral changes in the wave functions of complex molecules can also be represented as a sum of wave functions describing changes in the structural parts of a large molecule. Nevertheless, the core of large molecules can cause disturbances that should be considered. The proposed numerical method can be further used to verify experimental data on the optical properties of molecules. This technique makes it possible to predict the optical properties of nanostructures and carry out theoretical calculations of the conditions for highly coherent radiation of high intensity and a high degree of polarization. Permittivity describes both the molecule's optical response as well as the medium's response, which can refer to any solution or solid. The working hypothesis of new research may be to test this method on wet data since this article only considered dried samples.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

### Authors' ORCID ID

Iuliia Riabenko  <https://orcid.org/0000-0001-8682-8009>

Sergey Shulga  <https://orcid.org/0000-0002-9392-9366>

Konstantin Beloshenko  <https://orcid.org/0000-0002-9387-3147>

## REFERENCES

1. Sabnis RW. Handbook of fluorescent dyes and probes: Sabnis/handbook of fluorescent dyes and probes. 1st ed. Nashville, TN: John Wiley & Sons; 2015.
2. Christie RM. Fluorescent dyes. Handbook of textile and industrial dyeing. 562–87; 2011.

3. Sauer M, Hofkens J, Enderlein J. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from ensemble to single molecules. John Wiley & Sons; 2010.
4. Zehentbauer FM, Moretto C, Stephen R, Thevar T, Gilchrist JR, Pokrajac D, et al. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: concentration and solvent effects. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;121:147–51. <http://doi.org/10.1016/j.saa.2013.10.062>
5. Magde D, Wong R, Seybold PG. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields. *Photochem Photobiol.* 2002;75(4):327–34. [http://doi.org/10.1562/0031-8655\(2002\)0750327fqyatr2.0.co2](http://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750327fqyatr2.0.co2)
6. Gavrilenko VI, Noginov MA. Ab initio study of optical properties of rhodamine 6G molecular dimers. *J Chem Phys.* 2006;124(4):044301. <http://doi.org/10.1063/1.2158987>
7. Chapman M, Euler WB. Rhodamine 6G structural changes in water/ethanol mixed solvent. *J Fluores.* 2018;28(6):1431–7. <http://doi.org/10.1007/s10895-018-2318-0>
8. On C, Tanyi EK, Harrison E, Noginov MA. Effect of molecular concentration on spectroscopic properties of poly(methyl methacrylate) thin films doped with rhodamine 6G dye. *Opt Mater Express.* 2017;7(12):4286. <http://doi.org/10.1364/ome.7.004286>
9. Novoa-Ortega E, Dubnicka M, Euler WB. Structure-Property Relationships on the Optical Properties of Rhodamine Thin Films. *J Phys Chem C.* 2020;124(29):16058–68. <http://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c05139>
10. Mullen M, Euler WB. The influence of interfacial effects on the photophysics of rhodamine 6G thin films on a poly(vinylidene fluoride) surface. *Langmuir.* 2017;33(9):2194–204. <http://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00144>
11. Liu W-L, Bassett WP, Christensen JM, Dlott DD. Emission lifetimes of a fluorescent dye under shock compression. *J Phys Chem A.* 2015;119(44):10910–6. <http://doi.org/10.1021/acs.jpca.5b09695>
12. Popov P, Steinkerchner L, Mann EK. Molecular dynamics study of rhodamine 6G diffusion at n-decane–water interfaces. *Physical Review E.* 2015;91(5):053308. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.91.053308>
13. Brown KE, Fu Y, Shaw WL, Dlott DD. Time-resolved emission of dye probes in a shock-compressed polymer. *J Appl Phys.* 2012;112(10):103508. <http://doi.org/10.1063/1.4765687>
14. Curtis AD, Banishev AA, Shaw WL, Dlott DD. Laser-driven flyer plates for shock compression science: launch and target impact probed by photon Doppler velocimetry. *Rev Sci Instrum.* 2014;85(4):043908. <http://doi.org/10.1063/1.4871361>
15. Watanabe H, Hayazawa N, Inouye Y, Kawata S, DFT vibrational calculations of rhodamine 6G adsorbed on silver: analysis of tip-enhanced Raman spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B.* 2005;109(11):5012–5020. <https://doi.org/10.1021/jp045771u>
16. Zhou P. Why the lowest electronic excitations of rhodamines are overestimated by time-dependent density functional theory. *International Journal of Quantum Chemistry.* 2018; 118(23): e25780. <https://doi.org/10.1002/qua.25780>
17. Lower SK, El-Sayed MA. The triplet state and molecular electronic processes in organic molecules. *Chemical Reviews* 1966; 66(2): 199-241. <https://doi.org/10.1021/cr60240a004>
18. Pastore M, Fantacci S, De Angelis F. Modeling excited states and alignment of energy levels in dye-sensitized solar cells: successes, failures, and challenges. *The Journal of Physical Chemistry C.* 2013;117(8):3685-3700. <https://doi.org/10.1021/jp3095227>
19. Slanina T, Oberschmid T. Rhodamine 6g radical: A spectro (fluoro) electrochemical and transient spectroscopic study. *ChemCatChem.* 2018;10(18):4182–4190. <https://doi.org/10.1002/cctc.201800971>
20. Venkateswarlu P, George MC, Rao YV, Jagannath H, Chakrapani G, Miahnahri A. Transient excited singlet state absorption in Rhodamine 6G. *Pramana.* 1987;28:59–71. <https://doi.org/10.1007/BF02846809>
21. Jian W, Beloshenko KS, Makarovskiy M, Riabenko I, Shulga S, Prokhorenko S Resonance light absorption of granular aluminium and silver films placed on a rough sublayer of multilayered ZnS. *Ukrainian journal of physical optics.* 2019;(20):10–15. <https://doi.org/10.3116/16091833/20/1/10/2019>
22. Zheng Y, Beloshenko KS, Makarovskiy M, Guliyova Y, Shulga S, Wojnarowska R, et al. Study of plasma frequency for Al-In alloys with different concentrations. *Ukrainian journal of physical optics.* 2017;(18):225–231. <https://doi.org/10.3116/16091833/18/4/225/2017>
23. Fabian J, Hartmann H. Light absorption of organic colorants: theoretical treatment and empirical rules. Berlin-Heidelberg-New York: Springer-Verlag. 1980. <https://doi.org/10.1002/prac.19823240223>
24. Berger R. Computational chemistry. Introduction to the theory and applications of molecular and quantum mechanics. By Errol G. Iewars. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(38):4979–80. <http://doi.org/10.1002/anie.200485057>
25. Nagakura, S., & Baba, H. Dipole moments and near ultraviolet absorption of some monosubstituted benzenes—The effect of solvents and hydrogen bonding. *Journal of the American Chemical Society.* 1952;74(22):5693-5698. <https://doi.org/10.1021/ja01142a040>

26. Afsar MN, Birch JR, Clarke RN, Chantry GW. The measurement of the properties of materials. Proceedings of the IEEE, 1986;74(1):183-199. <https://doi.org/10.1109/PROC.1986.13432>
27. Landau LD, Lifshitz EM, Pitaevskii LP. Electrodynamics of continuous media. 2nd ed. Oxford, England: Butterworth-Heinemann; 1984.
28. Engerholm GG, Luntz AC, Gwinn WD, Harris DO. Ring Puckering in Five-Membered Rings. II. The Microwave Spectrum, Dipole Moment, and Barrier to Pseudorotation in Tetrahydrofuran. The Journal of Chemical Physics. 1969;50(6):2446-2457. <https://doi.org/10.1063/1.1671401>
29. Braak D, Mannhart J. Fermi's golden rule and the second law of thermodynamics. Foundations of Physics, 2020;50(11): 1509-1540. <https://doi.org/10.1007/s10701-020-00380-2>
30. Adler SL. Quantum theory of the dielectric constant in real solids. Physical Review. 1962;126(2):413. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.126.413>
31. Norambuena A, Tancara D, Coto R. Coding closed and open quantum systems in MATLAB: applications in quantum optics and condensed matter. European Journal of Physics, 2020 ;41(4): 045404. <https://doi.org/10.1088/1361-6404/ab8360>
32. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 09, Revision D. 01, Gaussian, Inc., Wallingford CT [Internet]. [cited 2009] Available from: <http://www.gaussian.com>
33. Hoffmann, Roald. How chemistry and physics meet in the solid state. Angewandte Chemie International Edition in English 1987; 26(9): 846-878. <https://doi.org/10.1002/anie.198708461>
34. Shimomura O, Yampolsky I. Bioluminescence: Chemical principles and methods (third edition): Chemical Principles and Methods. Shimomura O, Yampolsky IV, editors, Singapore: World Scientific Publishing; 2019.
35. Kubo R, Toyozawa Y. Application of the method of generating function to radiative and non-radiative transitions of a trapped electron in a crystal. Progress of Theoretical Physics. 1955;13(2):160-182. <https://doi.org/10.1143/PTP.13.160>
36. Demtröder W. Laser spectroscopy: Vol. 2: Experimental techniques. 4th ed. Berlin, Germany: Springer; 2008.
37. Ageev LA, Miloslavsky VK, Elshhab HI, Blokha VB. Educational experiments and demonstrations in optics. Kharkiv: KhNU; 2000. 176–178 p. (In Russian).
38. Ejuh, GW, Abe MO, Nya FT, Ndjaka JMB. Prediction of electronic structure, dielectric and thermodynamical properties of flurbiprofen by density functional theory calculation. Karbala International Journal of Modern Science. 2018;4(1):12-20. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.10.001>
39. Tang Z, Chang C, Bao F, Tian L, Liu H, Wang M, Zhu C, Xu J. Feasibility of Predicting Static Dielectric Constants of Polymer Materials: A Density Functional Theory Method. Polymers. 2021;13(2):284. <https://doi.org/10.3390/polym13020284>
40. Kreibig U, Vollmer M. Optical properties of metal clusters. 1995th ed. Berlin, Germany: Springer; 2013.
41. RCWA Solver Introduction – Ansys Optics [Internet]. [cited 2019, updated 2023] Available from: <https://optics.ansys.com/hc/en-us/articles/4414575008787-RCWA-Solver-Introduction>
42. Kitazawa T, Kitahara R, Yamagiwa T, Chakarothai J, Y. Hayashi and T. Kasuga. Basic Study on a Novel FDTD Method Implemented Frequency Dispersion of PCB. 2021 IEEE International Joint EMC/SI/PI and EMC Europe Symposium, Raleigh, North Carolina, USA; 2021. p. 580. <https://doi.org/10.1109/EMC/SI/PI/EMCEurope52599.2021.9559370>
43. Muller JM, Brunie N, Dinechin F, Jeannerod CP, Joldes M, Lefèvre V, et al. Handbook of floating-point arithmetic. Basel, Switzerland. Birkhäuser; 2018
44. Lax PD. Gibbs Phenomena. J Sci Comput 2006;28:445–449. <https://doi.org/10.1007/s10915-006-9075-y>

## РОЗРАХУНОК ВІДНОСНОЇ ДІЕЛЕКТРИЧНОЇ ПРОНИКНОСТІ РОДАМІНУ 6G КВАНТОВО-МЕХАНІЧНИМ МЕТОДОМ

Юлія Рябенко<sup>1,2\*</sup>, Сергій Шульга<sup>1</sup>, Костянтин Білошенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем,

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022 Україна;

<sup>2</sup>Інститут фізичної хімії, Центр фотоніки Аббе, Йенський університет ім. Фрідріха Шіллера,

Альберт-Ейнштейн-Штрассе, 9, 07745 Німеччина

\*e-mail: [jriabenco@karazin.ua](mailto:jriabenco@karazin.ua), [iuliia.riabenco@uni-jena.de](mailto:iuliia.riabenco@uni-jena.de)

Надійшла до редакції 17 липня 2023 р. Переглянута 29 вересня 2023 р.

Прийнята до друку 9 листопада 2023 р.

**Актуальність.** У статті описано квантово-механічний метод розрахунку діелектричної проникності органічних молекул на прикладі добре вивченої молекули Родаміну 6G. Вивчення оптичних властивостей великих органічних молекул вимагає не тільки експериментальних даних,

а й використання розрахунків, отриманих як аналітичним, так і чисельним шляхом.

**Мета.** Методи розрахунку діелектричної проникності як феноменологічної характеристики зразка повинні бути перевірені на добре вивчених молекулах, щоб надалі застосовуватися до більш складних нелінійних структур. Однак інтегральні зміни хвильових функцій великих молекул необхідно апроксимувати.

**Матеріал і методи.** Чисельне моделювання в MATLAB було проведено для порівняння з даними Gaussian 09, які є точними для таких не великих молекул, як Rhodamine 6G. У MATLAB було розраховано значення діелектричної проникності для частотних областей, що відповідають поглинанню та флуоресценції, на основі золотого правила Фермі. Отже, будь-яку молекулу можна представити як складну квантовомеханічну систему. У Gaussian 09 був використаний метод DFT для визначення діелектричної проникності.

**Результати.** Золоте правило Фермі можна застосувати завдяки представленню молекули як складної квантовомеханічної системи. Запропоновані чисельні методи мінімізують похибку за допомогою дельта-функції Дірака. Згідно з нашою гіпотезою, сума хвильових функцій частинки в потенційній ямі та частинки в кільці дорівнює хвильовій функції всієї системи, що дає можливість досліджувати великі молекули. В результаті розрахунку для двох довжин хвиль 337 та 573 нм, результати діелектричної проникності обчислені за допомогою запропонованого метода в MATLAB дорівнювали 2,98 та 6,27, відповідно. Ці самі параметри обчислені за допомогою Gaussian 09 дорівнювали 2,85 та 6,23.

**Висновок.** Порівняння результатів показує високий ступінь відповідності між наборами даних. Отже, гіпотеза та вибір методу були вірними. Посилення люмінесценції можна досягти зміною часу релаксації збудженого стану. Плазмонні наноструктури із задалегідь визначеними властивостями можуть керувати посилююче поле на квадрат модуля суперпозиції їх ближнього поля. Отже, умови для висококогерентного випромінювання з високою інтенсивністю та поляризацією можна передбачити та розрахувати до експериментів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** метод DFT; Золоте правило Фермі; дельта-функція Дірака; люмінесценція; Родамін 6G; хвильова функція

Оригінальна стаття

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-02>

УДК 577;636.09

## ПРОНИКНІСТЬ НАНОЧАСТИНОК C<sub>60</sub> ФУЛЕРЕНУ КРИЗЬ МОДЕЛЬНУ ЛІПІДНУ ОБОЛОНКУ КОРОНАВІРУСА ТА ЇХ ПРОТИКОРОНАВІРУСНА ДІЯ В СИСТЕМІ *IN OVO*

В. В. Гурмач<sup>1</sup>, В. Р. Караушу<sup>2</sup>, З. С. Клестова<sup>3</sup>, В. П. Берест<sup>4</sup>,  
Ю. І. Прилуцький<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна;

<sup>2</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна

<sup>3</sup> Інститут медичної вірусології та епідеміології вірусних захворювань, Ельфріде-Аульхорн-штрассе, 6, Тюбінген, 72076, Німеччина;

<sup>4</sup> Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, майдан Свободи, 4, м. Харків, 61022, Україна

\*e-mail: [prylut@ukr.net](mailto:prylut@ukr.net)

Надійшла до редакції 2 вересня 2023 р. Переглянута 21 листопада 2023 р.

Прийнята до друку 30 листопада 2023 р.

**Актуальність.** Актуальним питанням сучасної біомедицини є пошук потенційних шляхів щодо зменшення поширення коронавірусних інфекцій у популяціях людей і тварин та усунення впливу коронавірусу на їх організми.

**Мета роботи** полягала у визначенні структурної організації C<sub>60</sub> фулеренів у модельному клітинному середовищі, оцінці їх потенційної здатності проникати крізь модельну ліпідну оболонку коронавірусу, руйнуючи таким чином його цілісність, а також встановленню ефективності протикоронавірусної дії в системі *in ovo*.

**Матеріали і методи.** Дослідження проводили з використанням програмного пакета Gromacs 2020 і силового поля Charmm36. Для побудови ліпідної оболонки коронавірусу застосовували web-ресурс CHARMM-GUI. В експериментах *in ovo* на курячих ембріонах використали вірусологічні та токсикологічні методи.

**Результати.** Показано, що на початкових етапах молекулярної динаміки C<sub>60</sub> фулерен формує незначні за розміром нанокластери у кількості 7–16 молекул, на що впливає їх вихідна концентрація у модельному клітинному середовищі. При цьому форма наноструктур для кількості молекул понад 16 може відрізнятися від правильної сферичної. Встановлено, що C<sub>60</sub> фулерен та його нанокластери здатні проникати всередину ліпідної оболонки коронавірусу. Зокрема, поодинокі молекули C<sub>60</sub> може мігрувати, повністю заглиблюватися у ліпідну оболонку або

**Як цитувати:** Гурмач ВВ, Караушу ВР, Клестова ЗС, Берест ВП, Прилуцький ЮІ. Проникність наночастинок C<sub>60</sub> фулерену крізь модельну ліпідну оболонку коронавірусу та їх протикоронавірусна дія в системі *in ovo*. Біофізичний вісник. 2023;50:17–24. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-02>

**In cites:** Hurmach VV, Karaushu VR, Klestova ZS, Berest VP, Prylutskyu YuI. C<sub>60</sub> fullerene nanoparticles permeability through the model lipid envelope of coronavirus and their anticoronavirus effect in the *in ovo* system. Biophysical Bulletin. 2023;50:17–24. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-02>

**Open Access.** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

© Гурмач В. В., Караушу В. Р., Клестова З. С., Берест В. П., Прилуцький Ю. І., 2023.

пересуватися всередині неї. Встановлено, що водний розчин  $C_{60}$  фулеренів за максимально допустимої концентрації (МДК) 30 мкг/ембріон знижує інфекційну активність коронавірусу інфекційного бронхіту курей (ІБК) при його застосуванні через 1, 2 і 4 год після інфікування коронавірусом чутливої біологічної системи.

**Висновки.** Показано, що агрегація  $C_{60}$  фулеренів у модельному клітинному середовищі може відбуватися по-різному: або до проникнення у ліпідну оболонку коронавірусу, або всередині неї.  $C_{60}$  фулерени, як поодинокі, так і у складі нанокластерів, здатні утворювати пори в оболонці коронавірусу, руйнуючи його цілісність, що, можливо, призводить до порушення відповідних стадій циклу його реплікації та прикріплення до рецепторів клітини. Встановлено, що водний розчин  $C_{60}$  фулеренів при застосуванні за МДК проявляє протівірусну активність щодо коронавірусу ІБК на його ранніх стадіях взаємодії з клітиною (1–4 год).

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**  $C_{60}$  фулерен; коронавірус; молекулярна динаміка; протикоронавірусна активність.

Відповідно до звітів ВООЗ, незважаючи на оголошення про припинення пандемії, станом на сьогодні все ще спостерігається поширення коронавірусної інфекції COVID-19 у багатьох країнах світу. Саме тому дослідження потенційних шляхів нівелювання впливу коронавірусу SARS-CoV-2 та його штамів на організм людини є глобальним питанням сучасної біомедицини.

Сучасні нанобіотехнології можуть знайти застосування при вирішенні численних клінічних проблем, пов'язаних з пандемією COVID-19. Тому така біосумісна і біодоступна наноструктура як  $C_{60}$  фулерен викликає неабияку зацікавленість щодо застосування при коронавірусних інфекціях завдяки притаманній «специфічній» протівірусній активності [1]. Так, літературні дані [2] свідчать, що висока ліпофільність  $C_{60}$  фулерену зумовлює «мембранотропний» механізм його протівірусної дії. Відомо, що біологічні ефекти водорозчинних  $C_{60}$  фулеренів напряду корелюють з їх розмірами [3], тому на першому етапі дослідження важливим було оцінити розподіл за розміром цих наночастинок у модельному клітинному середовищі та їх здатність проникати крізь модельну ліпідну оболонку коронавірусу.

Важливо зазначити, що інфекційний бронхіт курей (ІБК) є однією з найбільш поширених вірусних інфекцій птахів, які завдають величезних економічних збитків птахівництву в усьому світі, включаючи Україну. Це захворювання високо контагіозне, уражає органи дихання (верхні дихальні шляхи) у курчат, репродуктивні органи з тривалим зниженням несучості у дорослих курей (*Gallus gallus*). Крім того, поширеним явищем є погіршення якості яєць та нефрит, який можуть викликати деякі штами цього вірусу. Інкубаційний період захворювання зазвичай становить 24–48 год, пік виділення вірусу з дихальних шляхів триває 3–5 днів після інфікування. На тяжкість захворювання та враження систем організму впливають як штам вірусу, так і вік, порода, імунний статус та раціон курки, холодострес.

РНК-геномний вірус з родини *Coronaviridae*, роду *Coronavirus*, гаммакоронавірус (*Gammacoronavirus*) птахів викликає ІБК. Віріони сферичної форми, діаметром 65–135 нм, вкриті ліпопротеїновою оболонкою з булавоподібними відростками завдовжки до 20 нм, що утворюють «сонячну корону». Цей коронавірус (*Avian infectious bronchitis virus*) представлений широким спектром сероваріантів. Встановлено понад 20 серотипів вірусу у всьому світі, які відрізняються між собою за антигенними та імунологічними властивостями. Через відсутність механізмів корекції під час реплікації генома вірус ІБК може швидко мутувати і генерувати нові штами, що можливо є схожим у нинішній ситуації з COVID-19, коли ми спостерігаємо швидкий мутаційний процес вірусу. Тому на другому етапі дослідження важливим було оцінити ефективність протівірусної дії водного розчину  $C_{60}$  фулеренів щодо коронавірусу ІБК в системі *in ovo*.

### МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

Усі розрахунки проводили у програмному пакеті Gromacs 2020 [4] і силовому полі Charmm36 [5]. Їх ключові етапи включали мінімізацію енергії та два кроки еквілібрації системи (NVT (constant Number of particles, Volume and Temperature) і NPT (constant Number of particles, Pressure and Temperature)). Молекулярну динаміку (МД) проводили упродовж 100 нс за температури 36°C.

Топологію для C<sub>60</sub> фулерену побудували, використовуючи онлайн сервер SwissParam [6]. Після цього ці наноструктури рандомно помістили у квадратний бокс та заповнили його молекулами води. Для імітації клітинного середовища до такої системи додавали іони Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> (їх концентрація складала 0,15 М). Базуючись на експериментальних даних щодо приготування і характеризування водного розчину C<sub>60</sub> фулеренів [7], загалом провели тестування трьох вихідних розчинів, що містили 5%, 10% і 15% молекул C<sub>60</sub>.

Для побудови ліпідної оболонки коронавірусу на основі фосфатидилхоліну (POPC) у кількості 1024 молекул було використано web-ресурс CHARMM-GUI [8].

Для отримання водного розчину C<sub>60</sub> фулеренів був застосований метод, заснований на переведенні молекул C<sub>60</sub> з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком [9]. Одержаний водний розчин C<sub>60</sub> фулеренів за максимальної концентрації 150 мкг/мл є типовим колоїдом, що містить як поодинокі молекули C<sub>60</sub>, так і їх наночастинки [7], і залишається високостабільним упродовж 18 місяців за температури +4°C.

Для проведення досліджень *in ovo* у курячих ембріонах (КЕ) необхідною умовою був підбір штаму вірусу ІБК з найвищою інфекційною активністю. Для цього було визначено інфекційну активність п'яти штамів вірусу ІБК. Підбір оптимального штаму для дослідження здійснювали за інокуляції 8-добових КЕ в об'ємі 0,2 см<sup>3</sup> вірусомісного матеріалу за умови дотримання правил асептики і антисептики. Спостереження проводили упродовж 8 діб, результати аналізували на 8 добу. Серед усіх перевірених штамів найбільш інфекційно активним виявився штам «M41» з інфекційною активністю вірусу —  $6,70 \pm 0,35 \lg \text{EID}_{50}/\text{cm}^3$ , який і було відібрано для подальших досліджень (Рис. 1).



Рис. 1. Вплив вірусу ІБК на інфіковані КЕ через 8 діб експерименту: А — контрольні інтактні ембріони; В — ембріони, інфіковані штамом «M41».

Fig. 1. The effect of chicken infectious bronchitis virus on infected chicken embryos after 8 days of the experiment: A — control intact embryos; B — embryos infected with strain "M41".

Відібрані для досліджень рухливі з добре розвинутими судинами КЕ 8 добового віку, інокульовані відповідно до розведення вірусу, вводили по 0,2 см<sup>3</sup> в алантоїсну

порожнину КЕ (по 4 ембріони на кожне десятикратне розведення від  $10^{-1}$  до  $10^{-6}$ ) [10]. Досліджували вплив водного розчину  $C_{60}$  фулеренів на КЕ через 1, 2, 4 і 6 год після інфікування КЕ коронавірусом ІБК шляхом внесення його у КЕ за максимально допустимої концентрації (МДК). Як контроль, використали КЕ, яким було інокульовано забуферений фізіологічний розчин. Ембріони в процесі інкубації овоскопували двічі на день. Процедуру повторювали тричі, з контролями. КЕ інкубували 8 діб за температури  $37^{\circ}\text{C}$  та відносної вологості 50–52%. Встановлено, що водний розчин  $C_{60}$  фулеренів є безпечним для застосування *in ovo* навіть у максимальному об'ємі введення — по  $1,0\text{ см}^3$  на КЕ незалежно від місця введення. Це є доволі важливий факт, оскільки спеціальна методична література [10] рекомендує максимальний об'єм введення лікарського препарату  $0,2\text{ см}^3$  на КЕ.

Протикоронавірусну дію досліджуваної нанополуки в системі *in ovo* визначали за співставленням рівней зниження інфекційної активності вірусу, яка виражається у показниках титру інфекційної активності вірусу [10].

Статистичну обробку результатів вимірювань проводили методами варіаційної статистики з використанням програми Statistica 13.3. При аналізі експериментальних даних у різних групах використовували t-критерій Стюдента, після чого виконували множинний порівняльний тест Даннета для порівняння всіх даних з контрольними. Припущення про те, що експериментальні дані відповідають нормальному розподілу та мають ідентичні стандартні відхилення були перевірені за допомогою тестів Шапіро-Уїлка та Бартлетта, відповідно. Повторюваність вимірювань складала не менше п'яти разів. При значенні  $p < 0,05$  відмінності вважалися значущими.

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що на початкових етапах МД  $C_{60}$  фулерен формує незначні за розміром нанокластери у кількості 7–16 молекул (Рис. 2; див. 5% розчин, 25 нс). Важливо зазначити, що на розмір нанокластеру, утвореного за той чи інший час, істотно впливає вихідна концентрація  $C_{60}$  фулеренів у модельному клітинному середовищі (Рис. 2; див. 10% і 15% розчини, 25 нс). Так, за високої вихідної концентрації  $C_{60}$  фулеренів, крім незначних за розміром наноагрегатів, утворюються також нанокластери розміром 25 і більше молекул  $C_{60}$ . Цікавим є те, що нанокластери розміром до 16 молекул здебільшого мають сферичну форму або наближену до такої (Рис. 2; див. 5% розчин, 25 нс), а у нанокластерів більшого розміру форма є неправильною (Рис. 2). На нашу думку, це пов'язано з тим, що нанокластери більшого розміру є більш рухливими і мають більшу ентропійну складову, яка не дозволяє їм набути сферичної форми. Наступні снапшоти МД чітко показують, що утворені на початку нанокластери  $C_{60}$  фулеренів мають тенденцію до збільшення свого розміру з часом.

Встановлено, що  $C_{60}$  фулерен та його нанокластери здатні проникати всередину ліпідної оболонки коронавірусу і згодом виходити з неї, що корелює з модельними розрахунками [11]. Так, на рис. 3А добре видно, як поодинокі молекули  $C_{60}$  повністю заглиблюються у ліпідну оболонку і упродовж МД пересуваються всередині неї. Дещо цікавіша ситуація спостерігалася для 10% і 15% розчинів молекул  $C_{60}$ . Тут  $C_{60}$  фулерен формує нанокластери з 2, 3 і 4 молекул, які, як виявилось, здатні швидше проникати всередину ліпідної оболонки та виходити з неї (Рис. 3В, С). Так, на рис. 3С має місце утворення майже рівностороннього трикутника з 3 молекул  $C_{60}$ , який починає занурюватися у ліпідну оболонку, а вже під кінець МД він перебуває з іншого її боку. Також добре видно утворення всередині ліпідної оболонки тетраедра з 4 молекул  $C_{60}$ . Інших геометричних утворень не спостерігали, хоча літературні дані [11] вказують на

потенційну можливість утворення таких наноструктур, як деформована/правильна тригональна біпіраміда (5 молекул  $C_{60}$ ), деформований октаедр (6 молекул  $C_{60}$ ) і суперкластери (10 і більше молекул  $C_{60}$ ).

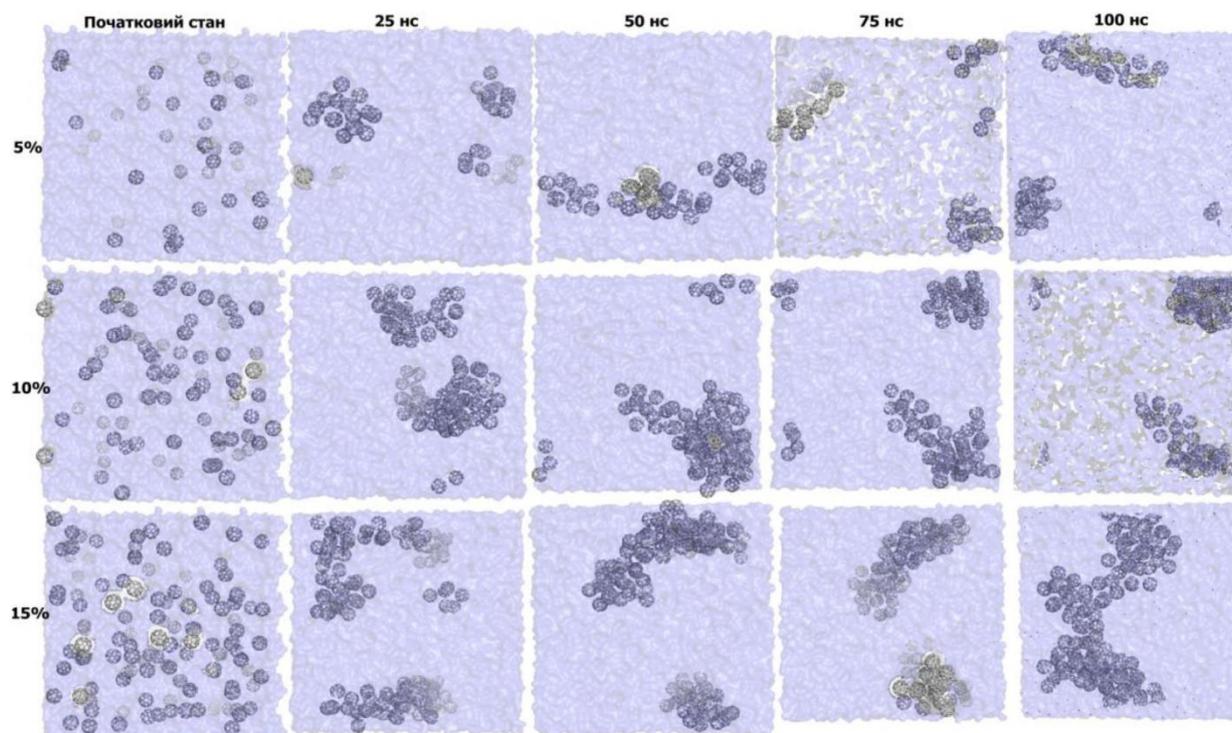


Рис. 2. Вигляд зверху боксів з різною концентрацією  $C_{60}$  фулеренів у модельному клітинному середовищі на різних етапах МД симуляції:  $C_{60}$  фулерен — сірий колір; бокс середовища — блакитний колір.

Fig. 2. Top view of boxes with different  $C_{60}$  fullerene concentration in the model cell medium at various stages of MD simulation:  $C_{60}$  fullerene — gray color; the environment box — blue color.

Нарешті, в експериментальній роботі [9] було показано, що водорозчинні  $C_{60}$  фулерени за низької концентрації  $10^{-5}$  М взаємодіють з плоскою двошаровою мембраною (сформована шляхом нанесення суміші фосфатидилхоліну та холестерину (1:1) у гептані через отвір діаметром 0,6 мм у тefлоновій чашці, яка містилася у скляній камері, за кімнатної температури), збільшуючи її питому провідність та електричну ємність, і утворюють в ній локальні дефекти — пори і канали.

При дослідженні серії концентрацій водного розчину  $C_{60}$  фулеренів у КЕ виявлено, що ця наносполука не викликала місцево-подразнюючої і токсичної дії за МДК (30 мкг/ембріон) упродовж 96 год.

Встановлено, що при внесенні водного розчину  $C_{60}$  фулеренів за МДК через 1 і 2 год інфікування КЕ коронавірусом ІБК титр інфекційної активності вірусу зменшився на однакову величину і склав  $5,45 \pm 0,30 \lg \text{ЕІД}_{50}/\text{см}^3$  у досліді проти значення  $6,70 \pm 0,35 \lg \text{ЕІД}_{50}/\text{см}^3$  у контролі (терапевтична схема застосування). При внесенні водного розчину  $C_{60}$  фулерену за МДК через 4 і 6 год інфікування КЕ коронавірусом ІБК титр інфекційної активності знизився і склав, відповідно,  $4,45 \pm 0,25 \lg \text{ЕІД}_{50}/\text{см}^3$  і  $6,45 \pm 0,33 \lg \text{ЕІД}_{50}/\text{см}^3$  у досліді проти значення  $6,70 \pm 0,35 \lg \text{ЕІД}_{50}/\text{см}^3$  у контролі.

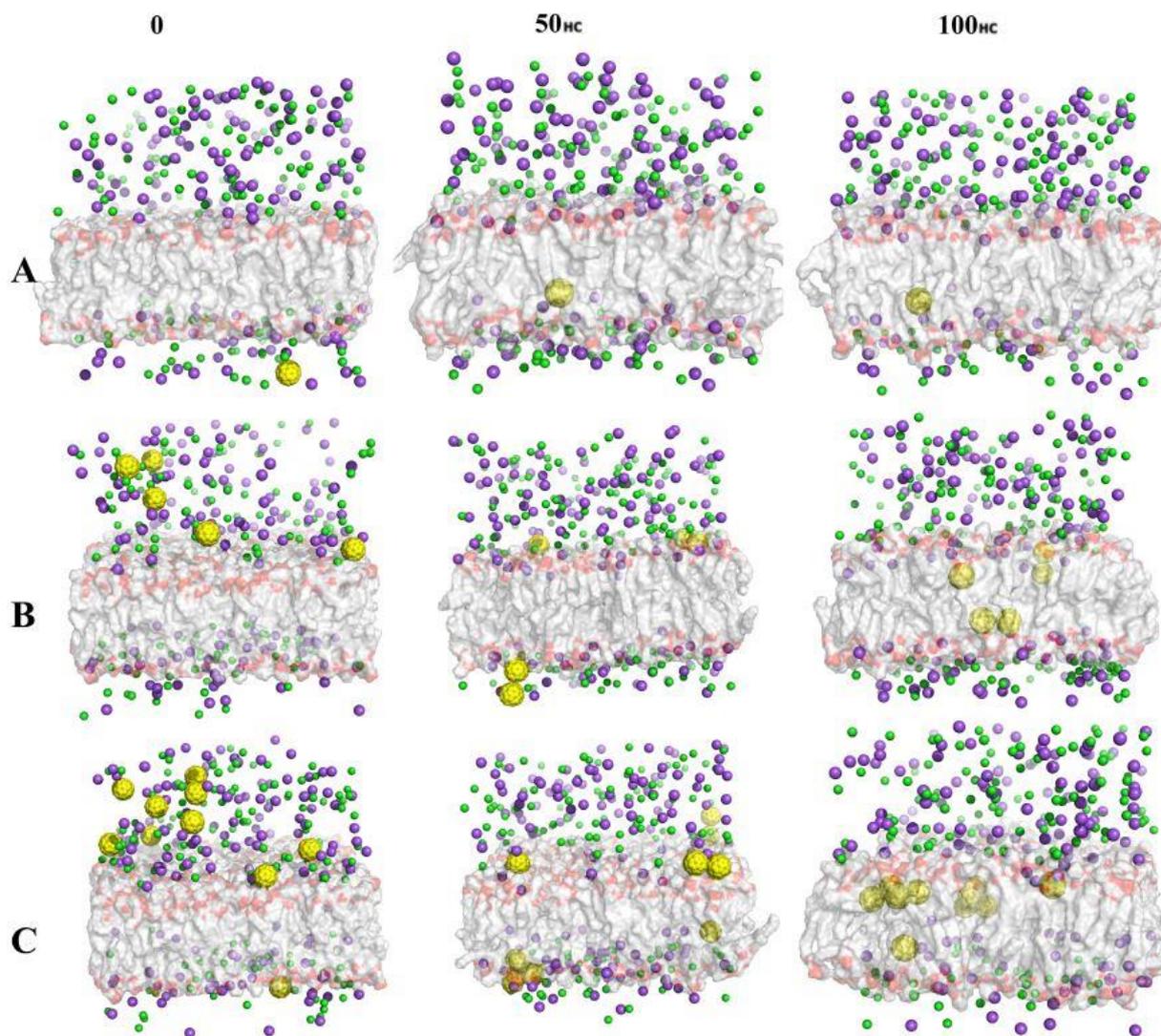


Рис. 3. Бічний вигляд побудованих систем з різною кількістю молекул  $C_{60}$  на різних етапах МД симуляції: ПОРС оболонка — сірого кольору;  $C_{60}$  фулерен — жовтого кольору; А — 5%, В — 10% і С — 15% розчин молекул  $C_{60}$ , відповідно.

Fig. 3. Side view of constructed systems with different numbers of  $C_{60}$  molecules at various stages of MD simulation: POPC envelope — gray color;  $C_{60}$  fullerene — yellow color; A — 5%, B — 10% and C — 15% solution of  $C_{60}$  molecules, respectively.

Таким чином, водний розчин  $C_{60}$  фулеренів за МДК знижує інфекційну активність коронавірусу ІБК при його застосуванні через 1, 2 і 4 год після інфікування коронавірусом чутливої біологічної системи. Найбільшого противірусного ефекту досягнуто при введенні дослідної нанополуки через 4 год після інфікування: зниження інфекційної активності на величину  $2,25 \lg \text{ЕД}_{50}/\text{см}^3$  є високим показником. При застосуванні водного розчину  $C_{60}$  фулеренів через 6 год після інфікування достовірного протикоронавірусного ефекту не виявлено. Одержані дані свідчать про те, що  $C_{60}$  фулерен діє на вірус у його ранніх стадіях реплікації (1–4 год) у чутливій біологічній системі, знижуючи інфекційні властивості коронавірусу ІБК, що добре узгоджується з попередніми результатами [12].

## ВИСНОВКИ

Таким чином, агрегація  $C_{60}$  фулеренів у модельному клітинному середовищі відбувається або до проникнення у ліпідну оболонку коронавірусу, або після проникнення всередині неї. Відтак, можна припустити, що поодинокі  $C_{60}$  фулерени або у складі нанокластерів здатні утворювати пори в оболонці коронавірусу, наприклад, SARS-CoV-2, руйнуючи цілісність його структури, що безумовно призведе до порушення відповідних стадій циклу реплікації цього коронавірусу.

Нарешті, водний розчин  $C_{60}$  фулеренів при застосуванні за МДК проявляє протівірусну активність щодо коронавірусу ІБК на його ранніх стадіях взаємодії з чутливою клітиною (1–4 год).

## КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.

### Authors' ORCID ID

В. В. Гурмач <https://orcid.org/0000-0002-0844-1586>

З. С. Клестова <https://orcid.org/0000-0003-0771-7808>

В. П. Берест <https://orcid.org/0000-0001-7779-154X>

Ю. І. Прилуцький <https://orcid.org/0000-0002-9847-4137>

## REFERENCES

1. Goodarzi S, Da Ros T, Conde J, Sefat F, Mozafari M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Mater Today*. 2017;20(8):460–80. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.03.017>
2. Piotrovsky LB, Kiselev OI. Fullerenes and viruses. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2005;12(1-2):397–403. <https://doi.org/10.1081/FST-120027198>
3. Melnyk MI, Ivanova IV, Dryn DO, Prylutsky YuI, Hurmach VV, Platonov M, et al.  $C_{60}$  fullerenes selectively inhibit  $BCa$  but not  $K_v$  channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Nanomedicine*. 2019;19:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.03.018>
4. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftWareX*. 2015;(1-2):19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
5. Huang J, MacKerell Jr AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem*. 2013;34(25):2135–45. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
6. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A. SwissParam: A fast force field generation tool for small organic molecules. *J Comput Chem*. 2011;32:2359–68. <https://doi.org/10.1002/jcc.21816>
7. Prilutski YuI, Durov SS, Yashchuk VN, Ogul'chansky TYu, Pogorelov VE, Astashkin YuA, et al. Theoretical predictions and experimental studies of self-organization  $C_{60}$  nanoparticles in water solution and on the support. *Eur Phys J D*. 1999;9(1–4):341–3. <https://doi.org/10.1007/s100530050452>
8. CHARMM-GUI Input Generator [Internet]. 2023 [cited 2023 Aug 28]. Available from: <https://www.charmm-gui.org/?doc=input/membrane.bilayer>
9. Prylutska SV, Matyshevska OP, Grynyuk II, Prylutsky YuI, Ritter U, Scharff P. Biological effects of  $C_{60}$  fullerenes in vitro and in a model system. *Mol Cryst Liq Cryst*. 2007;468:265–74. <https://doi.org/10.1080/15421400701230105>
10. Klestova ZS, Tashuta SG, Blotska OF, Kuzmitch GS, Kubayev AP, Krasnobayev EO. Determining the infectious activity of chicken infectious bronchitis virus in chicken embryos. State Scientific and Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms of Kyiv; 2020. Methodological recommendations approved by State Service of Ukraine on Security Issues of Food and Consumer Protection on Dec 18, 2020, record 3. (In Ukrainian)
11. Zhang S, Mu Y, Zhang JZH, Xu W. Effect of Self-Assembly of Fullerene Nano-Particles on Lipid Membrane. *PLoS ONE*. 2013;8:e77436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077436>
12. Hurmach V, Platonov M, Prylutska S, Klestova Z, Cherepanov V, Prylutsky Yu, et al. Anticoronavirus activity of water-soluble pristine  $C_{60}$  fullerenes: *in vitro* and *in silico* screenings. In: Asea AAA, Kaur P, eds. *Coronavirus Therapeutics — Volume I. Advances in Experimental Medicine and Biology 1352*. Springer; 2021. p. 159–72. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5_10)

**C<sub>60</sub> FULLERENE NANOPARTICLES PERMEABILITY THROUGH THE MODEL LIPID ENVELOPE OF CORONAVIRUS AND THEIR ANTICORONAVIRUS EFFECT IN THE *IN OVO* SYSTEM**

V. V. Hurmach<sup>1</sup>, V. R. Karaushu<sup>2</sup>, Z. S. Klestova<sup>3</sup>, V.P. Berest<sup>4</sup>, Yu. I. Prylutsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics, NASU, 150 Zabolotnogo Str., Kyiv, 03143, Ukraine;

<sup>2</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, ESC "Institute of Biology and Medicine", 64/13 Volodymyrska Str., Kyiv, 01601, Ukraine;

<sup>3</sup> The Institute for Medical Virology and Epidemiology of Viral Diseases, 6 Elfriede-Aulhorn-Straße, Tübingen, 72076, Germany;

<sup>4</sup> V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

\*e-mail: [prylut@ukr.net](mailto:prylut@ukr.net)

Submitted September 2, 2023; Revised November 21, 2023;

Accepted November 30, 2023

**Background:** An urgent problem of modern biomedicine is the search for potential ways to reduce the spread of coronavirus infections in human and animal populations and eliminate the impact of coronavirus on their bodies.

**Aim of the work** was to determine the structural organization of C<sub>60</sub> fullerenes in a model cell medium, to assess their potential ability to penetrate the model lipid envelope of a coronavirus, thus destroying its integrity, as well as the effectiveness of the anticoronavirus action in the *in ovo* system.

**Methods:** The research was conducted using the Gromacs 2020 software package and the Charmm36 force field. The CHARMM-GUI web resource was used to construct the lipid envelope of a coronavirus. Virological and toxicological methods were used in the *in ovo* experiments.

**Results:** It is shown that at the initial stages of molecular dynamics C<sub>60</sub> fullerene forms small nanoclusters in the amount of 7–16 molecules, which is affected by the initial concentration of C<sub>60</sub> fullerene in a model cell medium. At the same time, the shape of nanostructures for the number of molecules over 16 may differ from the correct spherical shape. It was established that C<sub>60</sub> fullerene and its nanoclusters are able to penetrate inside the lipid envelope of a coronavirus. In particular, a single C<sub>60</sub> molecule can migrate, completely embed itself in the lipid envelope, or move within it. It was found that C<sub>60</sub> fullerene aqueous solution, at the maximum permissible concentration (MPC) of 30 µg/embryo, reduces the infectious activity of the chicken infectious bronchitis (CIB) coronavirus when it is used 1, 2 and 4 h after the infection of a sensitive biological system with a coronavirus.

**Conclusions:** It is shown that aggregation of C<sub>60</sub> fullerene in a model cell medium can occur in different ways: either before penetration into the lipid envelope of a coronavirus, or inside it. C<sub>60</sub> fullerenes, both individually and as part of nanoclusters, are able to form pores in the envelope of a coronavirus, destroying its integrity, which possibly leads to disruption of the corresponding stages of its replication cycle and attachment to cell receptors. It was established that C<sub>60</sub> fullerene aqueous solution, when used in the MPC value, shows antiviral activity against the CIB coronavirus in its early stages of interaction with the cell (1–4 h).

**KEY WORDS:** C<sub>60</sub> fullerene; coronavirus; molecular dynamics; anticoronavirus activity.

*Original article*<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-03>

UDK 577.352.2:615.212

## KINETIC BIOPHARMACEUTICAL STUDIES OF A NEW PARACETAMOL–GLUCOSAMINE ANALGETIC DRUG

O. V. Vashchenko<sup>1,\*</sup>, O. A. Ruban<sup>2</sup>, I. V. Zupanets<sup>3</sup>, P. V. Vashchenko<sup>1</sup>,  
O. I. Ivaniuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Scintillation Materials SSI “Institute for Single Crystals”, NAS of Ukraine, 60 Nauky Ave., Kharkiv, 61072 Ukraine;

<sup>2</sup> National University of Pharmacy, 53 Pushkinska Str., Kharkiv, 61002, Ukraine;

<sup>3</sup> JSC Farmak, 63 Kyrylivska Str., Kyiv, 04080, Ukraine

\*e-mail: [olga\\_v@isma.kharkov.ua](mailto:olga_v@isma.kharkov.ua)

Submitted July 12, 2023; Revised December 17, 2023;

Accepted December 21, 2023

**Background:** Intercomponent drug interactions could play important role for drug release, membrane permeability and membranotropic action. Therefore, newly developed drugs need for checking their biopharmaceutical characteristics. A new analgetic drug based on paracetamol (Actimask® Acetaminoprofen) and a hepatoprotector N-acetyl-D-glucosamine has been developed, with increased safety and potentiation of the analgesic effect (*Ruban O., 2022*). Multibilayer lipid membranes were chosen as promising testing medium due to their proved appropriation and sensitivity for study multi-compound drug-membrane interactions. It is the basis for a kinetic approach allowing elucidation of biopharmaceutical interactions in model membrane medium.

**Objectives:** Revealing changes of paracetamol release and membrane penetration in the new paracetamol-glucosamine analgetic drug as well as estimation the rationale of the approach developed to trace biopharmaceutical interactions in model membrane medium.

**Materials and Methods:** *L*- $\alpha$ -dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) multibilayer membrane was used as a model biomimetic testing medium. Differential scanning calorimetry (DSC) was applicated to trace kinetics of drug-membrane interactions.

**Results:** Gelatin as a part of Actimask® increased the characteristic time of paracetamol diffusion about threefold, but it had no pronounced effect on the equilibrium paracetamol penetration into the membrane. Sole glucosamine manifested no membranotropic effect under the experimental conditions, however, in combination with gelatin, it sufficiently reduced equilibrium paracetamol penetration while paracetamol diffusion remained within the experimental error. The full drug formulation increased membranotropic effect by 34 % in compared with sole paracetamol.

**Conclusions:** Glucosamine and gelatin can affect both kinetic and equilibrium parameters of paracetamol-membrane interactions, while the full set of the drug components is able to increase the effect which correlates well with the previously established enhancement of analgetic effect of the drugs. The approach developed allows accurate tracing of drug release and membrane penetration depending on a set of drug components. Generally, the results obtained prove the rationale of applying the approach to pre-clinical drug examination.

**KEY WORDS:** nanostructured materials; model lipid membranes; paracetamol; N-acetyl-D-glucosamine; biopharmaceutical interactions; differential scanning calorimetry.

**In cites:** Vashchenko OV, Ruban OA, Zupanets IV, Vashchenko PV, Ivaniuk OI. Kinetic biopharmaceutical studies of a new paracetamol–glucosamine analgetic drug. 2023;50:25–35. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-03>

**Open Access.** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

© Vashchenko O. V., Ruban O. A., Zupanets I. V., Vashchenko P. V., Ivaniuk O. I., 2023.

Paracetamol is known as a worldwide analgesic that and the first-line drug for the treatment of pain and fever in patients of all ages. It is belonged to the group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), together with aspirin, ibuprofen, diclofenac and a number of other broadly used analgetic substances. However, a side effect of paracetamol is hepatotoxicity. To avoid it, N-acetyl-D-glucosamine (NAG) was used in a drug formulation as a hepatoprotector. It was established that the paracetamol–NAG combination leads to increased safety and potentiation of the analgesic effect of the drug [1]. Microgranules of paracetamol in a gelatin shell (Actimask® Acetaminopfen) was used in order to create the drug in the form of orally disintegrating tablet, which provides greater compliance for treatment and contributes to the onset of an analgesic effect; besides, covering paracetamol with a gelatin shell is due to the improvement of its organoleptic properties.

However, it is well known that any changes in tablet formulation could significantly affect drug bioavailability, so relevant question is to explore biopharmaceutical properties of the new drug. This issue, in turn, refers to the common problem of drug-excipient interactions [2], which should be discussed in more details.

An excipient is a natural or synthetic material added to dosage forms along with the active pharmaceutical ingredient (API) as either functional or non-functional agents [3]. Generally, excipients can exert multiple roles in a dosage form, so the selection of drug compounds is considered as crucial in any drug formulation design [3, 4]. Though excipients are considered as (therapeutically) inert, they are able to interact with reactive functional groups of an API in different ways [4]. It is commonly accepted that any form of physicochemical interaction involving drug molecules will potentially affect drugs' stability and bioavailability [4]. Last decades, the interest to drug-excipient interactions arises due to establishing of its ability to impact on drug effectiveness and, hence, to be a significant for drug adsorption by organism tissues [2, 5]. For example, ionic interaction between cationic drugs and anionic superdisintegrants resulted in the delayed release and poor dissolution of drugs [6].

Literature suggested numerous examples of physicochemical drugs interactions and each of them is of high importance for treatment processes. So, emerging trends in the design and development of drug products indicate ever greater need for in-depth understanding of the roles of drug compound in drug delivery applications [3]. Naturally, the phenomenon is not only limited by drug-excipient interactions but could equally be applied to API-API interactions (in the case when several APIs are formulated in the same product), so it might be generally referred as intercomponent drug interactions.

Nowadays, this issue is considered in several aspects [2–4, 6–8]: (i) intercomponent interactions within a dosage form, or pharmaceutical incomparability; (ii) affecting drug release, solubility and bioavailability from the dosage form as well as its biopharmaceutical interactions; (iii) usage of excipients as drug delivery systems. The vast majority of the works on this matter is devoted to physicochemical interactions between certain drug components during the processes of API release/dissolution from a dosage form into water medium. Meanwhile, the next step of drug delivery, namely, drug-membrane interactions, is just as essential for bioavailability [4]. It is important that API penetration is usually carried out by passive diffusion through the lipid bilayer of cells [9]. The interaction of drugs with the lipid bilayer of biomembranes is inevitable, since a route of API administration (penetration into the systemic bloodstream, entry into the target cell, metabolism, etc.) is accompanied by interactions with a large number of cells barriers. Drug-membrane interactions seem to be of essential importance when dissolution is not the rate-limiting step of drug administration [2]. Moreover, improvement of membrane permeability by an excipient is thought to be a direct reason to improve drug bioavailability [4].

Generally, drug-membrane interaction is a complex and mutual process. Indeed, on the one hand, it affects the pharmacokinetic properties of pharmaceuticals, and on the other, it impacts on the structural and functional properties of the membranes themselves [10–12]. Besides, it could be an intrinsic part of biological effect of a drug, as it was shown for API of various classes. In particular, NSAIDs are characterized by strong drug-lipid interactions [13] being extended between the polar and hydrophobic segments of lipid bilayers [14]. Their membranotropic effect was established as detergent-like [15] or decreasing membrane melting transition point, thus enhancing the permeability of the membrane [16]. For a number of NSAIDs, it was shown that disruption of the cell membrane barrier is an important component in the drugs pathogenesis [8]. It was also established that NSAID toxicity is associated with the ability of the drug to modify the gastroenteric surface hydrophobic barrier through interaction with endogenous phosphatidylcholines [8]. These findings have indeed been providing evidences that the effect of NSAIDs at membrane level may be an additional mechanism of action and toxicity of NSAIDs [17] and highlight deep relationship between their membranotropic action and pharmacological activity (both therapeutic and negative side effects).

Up to date, a set of data has gained which evidence that the presence of foreign molecules could affect drug-membrane interactions [18, 19]. For example, as it was established for a large group of anti-inflammatory drugs, their transdermal permeability is elevated in the presence of lauric acid [19]. In spite of this, there are comparatively small number of works elucidating drug-excipient interactions in membrane medium, probably due to lack of proper methods and approaches.

As it was shown in our previous works, a set of excipients could serve as a modulating factor for API-membrane interactions [11, 20, 21]. In particular, azithromycin distribution into dipalmitoylphosphatidylcholine membrane varied depending on drug formulation [21]. Here, it should be noted that such modulation could either result from direct intercomponent interactions or appear explicitly at the stage of drug–membrane interactions. The former type of intercomponent interactions may be referred as membrane-mediated interactions; it was actually exemplified in [22–27]. The matter is just starting to develop but seems powerful and promising from practical viewpoint. For example, reduction of drug release by magnesium stearate is canonically attributed to generation of barrier to the aqueous environment [28], however another reason could be formation of drug-excipient complexes in membrane medium, as it was shown in [20].

One of the most appropriated techniques to explore this matter is differential scanning calorimetry (DSC). On the one hand, it is known as a powerful and high selective tool to study drug-membrane interactions [29, 30] and on the other hand, it is widely used to predict various types of physicochemical drug–excipients interactions [4]. Our previous works involving DSC to drug-membrane interactions demonstrated effectiveness of kinetic regime to exploring membranotropic effect of various drugs combinations [31]. To this end, in the present work, we focused on investigation of kinetic effects of drug components on paracetamol release and distribution over model membrane medium. The aim of the work is to demonstrate possibilities of using kinetic DSC approach to explore changes of biopharmaceutical interactions depending on drug formulation, namely (1) reveal changes of paracetamol release and membrane penetration in the new paracetamol–glucosamine analgetic drug and (2) estimate the rationale of the approach developed to trace biopharmaceutical interactions in model membrane medium.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Pharmaceutical composition of paracetamol with N-acetyl-D-glucosamine***

To create the pharmaceutical composition we used: Paracetamol (Anqiu Lu`an

Pharmaceutical Co., China) or gelatin-coated paracetamol (Actimask® Acetaminophen, SPI Pharma, USA), N-acetyl-D-glucosamine (Zhejiang Candorly Pharmaceutical, China), Plasdone S-630 (ISP, Switzerland), Kolidon CL (BASF, Germany), citric acid (Merck, Germany), sodium bicarbonate (Merck, Germany), Lubripharm (SPI Pharma, USA), Aspartame (Hyet Sweet, France), Orange flavor (Kerry, Italy).

Taken together, NAG and Actimask® consisted 63 % of tablet mass.

#### ***Lipid membrane preparation***

L- $\alpha$ -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) membranes were prepared on the basis of DMPC of high purity (Avanti Polar Lipids) using Mettler XP 26 microbalance (Mettler Toledo). 70 % wt/wt hydrated samples were obtained by adding a corresponding amount of bidistilled water. Then, the samples were incubated at 275-278 K for several days in order to provide water – lipid equilibrium. Additionally, regular agitations and heating above 320 K were applied. The initial value of water content was maintained by addition of bidistilled water in proper amount.

#### ***Kinetic studies***

Differential scanning calorimetry (DSC) technique was involved to treat the process of drug-membrane interactions. Original DSC profiles were obtained using a DSC 1 microcalorimeter (Mettler Toledo). Sample mass was 10 to 15 mg. Paracetamol content was 6 % wt/wt in all the samples. The ratios of other compound were the same as in the tablet-mass.

Before the procedure of DSC profiles recording, the necessary drugs amount was placed into a 40  $\mu$ l standard aluminum crucible, then it was covered by neat DMPC membrane. This moment was count as time zero. Then a sample was placed into the measurement cell and underwent consequence heating scans in temperature diapason 273 to 308 K at scanning rate 0.3 K/s.

The procedure of DSC profiles recording has been performed until system equilibrium was reached (i.e. until no further changes of DSC profiles were observed). For each sample, 15 to 20 repeated DSC scans were performed during 120 to 170 hrs. of sample treatment. Neat DMPC membrane was examined under the same conditions as a control. Between the scans, the samples were stored at room conditions. Original DSC data were further processed by means of Star<sup>c</sup> SW 11.0 software.

### **RESULTS AND DISCUSSION**

In the present study, multilamellar model membrane of hydrated L- $\alpha$ -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) was used as testing medium. Under experimental conditions, this membrane possesses a periodic lamellar structure with interlamellar repeat distance ab. 6–7 nm depending on temperature [32]. DMPC membrane is known to undergo the 1<sup>st</sup> order phase transition ‘gel to liquid crystal’ (membrane melting) under room temperatures which makes it convenient to explore drug-membrane interactions with a minimum risk of thermal destruction of the substances examined. Kinetics of drug administration into DMPC membrane was monitored using changes of DSC profiles during time of equilibration. Several types of systems were investigated, viz., DMPC membrane containing a selected drug component (paracetamol, NAG), certain drug combinations (e.g., Actimask® + NAG) or the full drug formulation (tablet). Original DSC thermograms of the systems were reported in [1]. Here, we present further data treatment allowing us to obtain quantitative characteristics of drug-membrane interactions.

Taken into account complex character of the DSC peak obtained during equilibration time, it seemed reasonable to perform some fitting procedure to describe the process

quantitatively. For this purpose, a DMPC melting peak was fitted by two ones which reflect existence of membrane portions with different drug content. The fitting procedure and determination of the lower peak fraction ( $\eta$ ) are illustrated in Fig. 1. Coefficient of determination  $R^2 > 0.98$  was taken as a fitting criterion. All the systems examined met the criterion, except some samples contained the tablet.

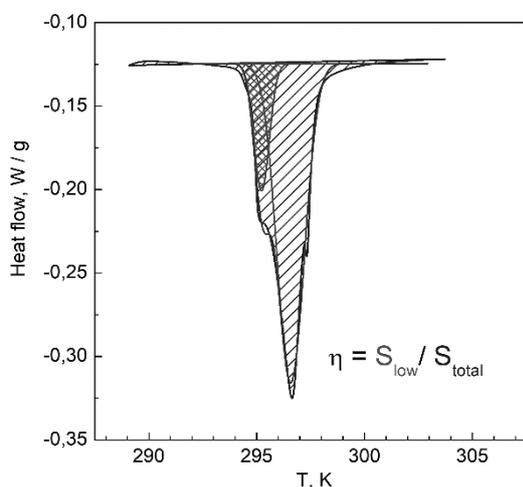


Fig. 1. DSC profile for DMPC membrane containing paracetamol (1<sup>st</sup> scan,  $t = 1080$  s). Fitting of the melting peak by two Gaussians. The lower peak fraction ( $\eta$ ) was determined as the ratio of the lower peak area ( $S_{low}$ ) to the total original peak area ( $S_{total}$ ).

The data obtained after the abovementioned processing were plotted as dependences of the lower peak and the upper peak temperatures on equilibration time. Initial steps of equilibration for different systems are depicted in Fig. 2.

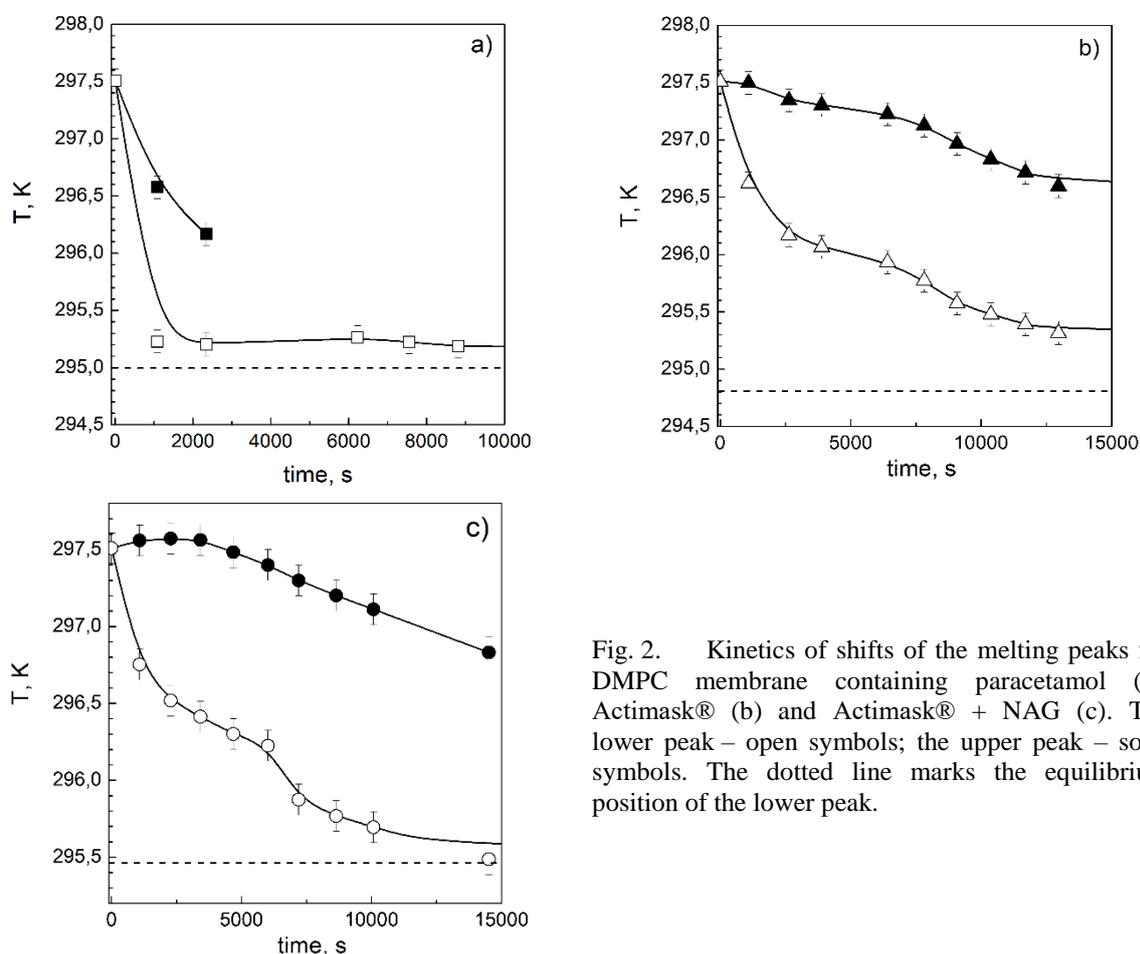


Fig. 2. Kinetics of shifts of the melting peaks for DMPC membrane containing paracetamol (a), Actimask® (b) and Actimask® + NAG (c). The lower peak – open symbols; the upper peak – solid symbols. The dotted line marks the equilibrium position of the lower peak.

As one can see, for the membrane containing sole paracetamol, the lower peak appeared yet in the 1<sup>st</sup> scan (Fig. 1) and then maintained very close to its equilibrium value (Fig. 2, a). So, one could ascribe it to the portion of membrane saturated with paracetamol. Such rapid paracetamol distribution observed under the experimental conditions is in line both with known high penetrating ability of paracetamol and with the data of MD simulation of paracetamol-DMPC interactions [33]. At the same time, the upper peak decreased much faster and merged the lower peak completely after just the 3<sup>rd</sup> scan, reflecting equilibrium paracetamol distribution over a sample. Grounding on the above, parameter  $\eta$  seems appropriate to describe kinetics of paracetamol distribution over the membrane medium. For sole paracetamol, the value of  $\eta$  became equal to 1 after approx.  $2.5 \cdot 10^3$  s.

The pattern changed significantly with application of Actimask® instead of paracetamol (Fig. 2, b). Here, the lower peak shifts gradually toward its equilibrium position, but does not reach it even within  $15 \cdot 10^3$  s. The upper peak exists during the same time period indicating non-homogeneous distribution of paracetamol throughout the membrane. Such effect is most likely evinces hindering of paracetamol release into the membrane medium due to gelatin coating of Actimask® microgranules. Reduced drug release from gelatin-coated capsules is a known effect of drug-exciipient interactions, particularly for paracetamol [34, 35] so the effect observed testify in favor of relevance of the approach developed.

As for NAG, there were no visible changes of DSC profiles observed during  $6 \cdot 10^5$  s (data are not shown), though it does not generally mean the absence of NAG – membrane interactions. Being taken together with Actimask®, NAG restricts changes of the both peaks and moves the resulting peak temperatures to relatively higher values (Fig. 2, c).

In Fig. 3, time dependences of the lower peaks in various systems are compared. For the system with Actimask®, it can be evident that though the equilibration value is reached much more slowly, it finally matches up (within the experimental error) with that for sole paracetamol. To our mind, such coincidence shows complete paracetamol release from the microgranules. Whilst, under joint Actimask® + NAG application, the equilibrium paracetamol effect appears much slighter, probably reflecting reduction of paracetamol distribution into membrane caused by the presence of NAG. Meanwhile, introduction of the tablet causes additional membrane fluidizing comparative to sole paracetamol. To our mind, such effect could be resulted from both enhancement of paracetamol distribution into membrane and its overlapping with membranotropic effect of other drug components. But anyway, such membrane fluidization correlates well with the previously established enhancement of analgetic effect of the drug [1].

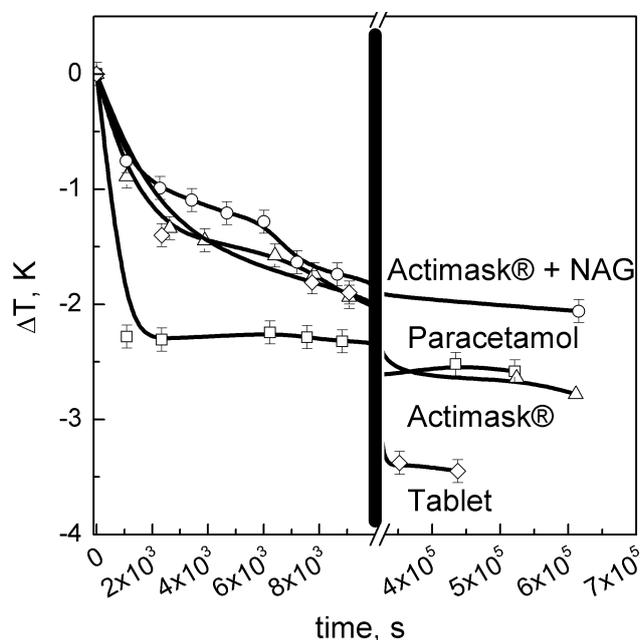


Fig. 3. Kinetics of shift of the lower melting peak for DMPC membrane containing various compounds of the paracetamol-glucosamine drug. The vertical line marks the break region.

Analysis of  $\Delta T(t)$  dependences (Fig. 3) allowed us to determine some parameters of paracetamol – membrane biopharmaceutical interactions. In particular, the equilibrium paracetamol penetration into the membrane ( $D_{eq}$ ) was determined as shift of the lower peak corresponding to equilibration time. The characteristic time of paracetamol diffusion ( $\tau$ ) was obtained by approximation of  $\Delta T(t)$  dependences with descending exponents. Paracetamol distribution over the membrane during the first 100 min of observation ( $\eta_{100}$ ) reflect its diffusion through water-lipid barriers.

The obtained parameters of biopharmaceutical interactions are collected in Table 1. They indicate that gelatin as a compound of Actimask® increases  $\tau$  about threefold, but has no obvious effect on  $D_{eq}$ . Combination Actimask® + NAG hinders paracetamol diffusion (lowering of  $\eta_{100}$ ) and diminishes  $D_{eq}$  by 20 %. However, the tablet increases  $D_{eq}$  by a third (34 %) relative to the sole paracetamol.

Table 1. Parameters of biopharmaceutical interactions.

Components	Kinetic		Equilibrium	
	$\tau$ , min	$\eta_{100}$ *	$D_{eq}$ , K	$\delta D_{eq}$ , %
Paracetamol	0.10	1.0	-2.6	0
Actimask®	0.37	0.9	-2.8	+8
Actimask® + NAG	0.32	0.7	-2.1	-20
Tablet	–	–	-3.5	+34

\* Lower peak fraction after 100 min of equilibration

Equilibrium profiles of specific heat capacity ( $C_p$ ) were obtained from corresponding DSC thermograms (Fig. 4). The temperature regime of thermal analysis of DMPC membrane was chosen so that to obtain information about two its intrinsic phase transitions around physiological temperatures [36, 37] as well as to avoid peak distortion due to non-optimal scanning rate [38]. The resulting  $C_p$  profile of the neat membrane contains two peaks. The sharp peak at 297.5 K reflects the membrane melting and was taken as a reference. Another one, at 288.6 K, corresponds to so-called pre-transition [36]. It disappears completely under drugs introduction. As one can see,  $C_p$  profiles of almost all systems contains a single sharp melting peak a few degrees below the reference. It suggests that in equilibrium state paracetamol distributes homogeneously over the DMPC membrane both in combinations with

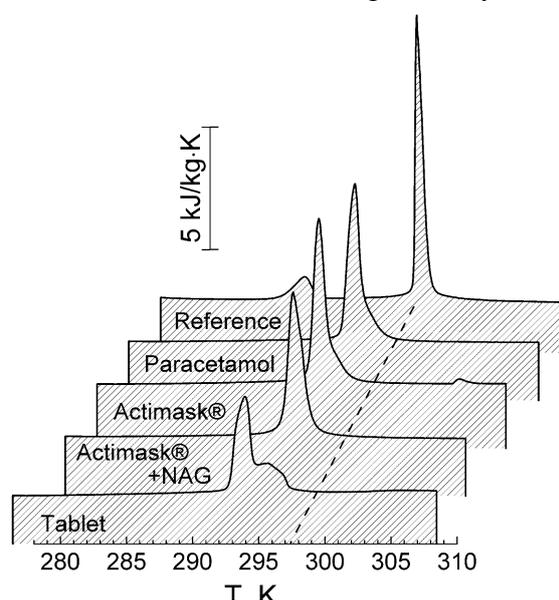


Fig. 4. Equilibrium profiles of specific heat capacity ( $C_p$ ) for DMPC membrane containing various compounds of the paracetamol–glucosamine drug. The dotted line marks position of the reference peak (melting of neat DMPC membrane).

gelatin and with NAG. The only exception is  $C_p$  profile for membrane with the tablet which contains an additional broad peak above the paracetamol one. It obviously indicates individual interactions of other compounds of the drug with DMPC membrane. A small high-temperature thermal event observed for the membrane with Actimask® may be attributed to a membrane portion bound to sole gelatin.

The spectrum of possible underlying mechanisms of intercomponent interactions in the tablet is rather wide [2]. Generally, it could be relay to the rate and extent of drug dissolution and release, changes in the permeability of the membrane or in the stability of the drug. As for paracetamol, there are literature data concerning its pharmacological interactions with mannitol, vanillin and methylparaben [39, 40]. Besides, reducing paracetamol activity relative to hepatocyte membranes were reported for its combinations with acetylcysteine and Ca-pantothenate [41]. However, none of the substances listed is present in the composition of the drug examined, so there is insufficient basis for further speculations about the effects observed.

Thus, revealing of specific mechanisms of biopharmaceutical interactions for the paracetamol-glucosamine drug obviously requires more detailed studies. Meanwhile, the approach developed seems appropriate and instructive for exploring such kind of problems.

### CONCLUSIONS

A new approach was developed allowing to elucidate biopharmaceutical intercomponent interactions in drug formulations and their impact on drug-membrane interactions. It was exemplified in a new paracetamol–glucosamine analgetic drug with reduced negative side hepatotoxic effect of paracetamol. Series of DSC profiles obtained for phase transitions of DMPC membrane allowed us to trace paracetamol release and distribution.

Paracetamol was established to be capable of fast and homogeneous distribution throughout the membrane in full accordance with its known high membrane permeability. As a part of Actimask® Acetaminophen (gelatin-coated paracetamol microgranules), paracetamol saturated the membrane three times slower, though the equilibrium paracetamol penetration into the membrane was the same as for the sole paracetamol within experimental error. Such effect could be most likely attributed to hindered paracetamol release from the microgranules.

N-acetyl-D-glucosamine, another API in the drug formulation, had no pronounced effect on DSC profiles. Meanwhile, taken together with Actimask®, it caused diminishing of paracetamol distribution into the membrane. The full drug formulation had slight influence on the initial steps of paracetamol distribution comparing to Actimask® + NAG. Meanwhile, the tablet had increased membranotropic effect in the equilibrium state which correlates well with the previously established enhancement of analgetic effect of the drugs.

Thus, the approach developed allows accurate tracing drug release and membrane penetration depending on a set of excipients. Generally, the results obtained prove the rationale of the approach developed in applying to pre-clinical drug examination.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Prof. L. N. Lisetski for helpful remarks concerning the work.

### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interests.

#### Authors' ORCID ID

O. V. Vashchenko  <https://orcid.org/0000-0002-7447-9080>

O. A. Ruban  <https://orcid.org/0000-0002-2456-8210>  
 I. V. Zupanets  <https://orcid.org/0000-0002-8762-0098>  
 P. V. Vashchenko  <https://orcid.org/0009-0000-2657-8618>  
 O. I. Ivaniuk  <https://orcid.org/0000-0002-7103-8423>

#### REFERENCES

- Ruban O, Zupanets I, Kolisnyk T, Shebeka S, Vashchenko O, Zimin S, et al. Pharmacological and biopharmaceutical studies of paracetamol and N-acetyl-D-glucosamine combination as an analgetic drug. *ScienceRise: Pharm. Sci.* 2022;35(1):28–36. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.253474>
- Jackson K, Young D, Pant S. Drug-excipient interactions and their affect on absorption. *Pharmaceutical Science & Technology Today.* 2000;3(10):336–45. [https://doi.org/10.1016/s1461-5347\(00\)00301-1](https://doi.org/10.1016/s1461-5347(00)00301-1)
- Narang AS, Boddu SHS. Excipient applications in formulation design and drug delivery. In: Narang AS, Boddu SHS, editors. *Excipient applications in formulation design and drug delivery.* Springer International Publishing Switzerland; 2015. Chapt. 1. p. 1–10. [http://doi.org/10.1007/978-3-319-20206-8\\_1](http://doi.org/10.1007/978-3-319-20206-8_1)
- Gorain B, Choudhury H, Pandey M, Madheswaran T, Kesharwani P, Tekade RK. Drug-excipient interaction and incompatibilities. In: Rakesh K, editor. *Dosage form design parameters.* Vol. II. *Advances in pharmaceutical product development and research.* Academic Press; 2018. p. 363–402. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814421-3.00011-7>
- Bharate SS, Bharate SB, Bajaj AN. Interactions and incompatibilities of pharmaceutical excipients with active pharmaceutical ingredients: a comprehensive review. *J Excipients Food Chem.* 2010;1(3):3–27.
- Balasubramaniam J, Bindu K, Rao VU, Ray D, Haldar R, Brzezczko AW. Effect of superdisintegrants on dissolution of cationic drugs. *Dissol. Technol.* 2008;15(2):18–25. <https://doi.org/10.14227/DT150208P18>
- Kolisnyk T, Vashchenko O, Ruban O, Fil N, Slipchenko G. Assessing compatibility of excipients selected for sustained release formulation of bilberry leaf extract. *Braz J Pharm Sci.* 2022;58. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902022e19753>
- Lichtenberger LM, Barron M, Marathi U. Association of phosphatidylcholine and NSAIDS as a novel strategy to reduce gastrointestinal toxicity. *Drugs Today.* 2009;45(12):877–90. <https://doi.org/10.1396674/dot.2009.45.12.1441075>
- Orme M. Drug absorption in the gut. *Br J Anaesth.* 1984;56:59–67. <https://doi.org/10.1093/bja/56.1.59>
- Seydel JK, Wiese M. Drug-membrane interactions: analysis, drug distribution, modeling. In: Mannhold R, Kubinyi H, Folkers G, editors. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry.* Vol. 15. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002. 349 p.
- Vashchenko OV. Individual and joint interactions of components of medicinal products with model lipid membranes [dissertation]. D. Sc. thesis. Kharkiv; 2020. 363 p. (in Ukrainian) Available from: [https://rbeccs.karazin.ua/wp-content/uploads/2018/dis/dis\\_Vashchenko.pdf](https://rbeccs.karazin.ua/wp-content/uploads/2018/dis/dis_Vashchenko.pdf)
- Lucio M, Lima J, Reis S. Drug-membrane interactions: significance for medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 2010;17:1795–809. <https://doi.org/10.2174/092986710791111233>
- Lopes LB, Scarpa MV, Pereira NL, de Oliveira LC, Oliveira AG. Interaction of sodium diclofenac with freeze-dried soya phosphatidylcholine and unilamellar liposomes. *Rev Bras Cienc Farm.* 2006;42(4):497–504. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322006000400004>
- Kyrikou I, Hadjikakou SK, Kovala-Demertzi D, Viras K, Mavromoustakos T. Effects of non-steroid anti-inflammatory drugs in membrane bilayers. *Chem Phys Lipids.* 2004;132(2):157–69. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2004.06.005>
- Sun S, Sendeck AM, Pullanchery S, Huang D, Yang T, Cremer PS. Multistep Interactions between ibuprofen and lipid membranes. *Langmuir.* 2018;34(36):10782–92. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01878>
- Panicker L, Sharma VK, Datta G, Deniz KU, Parvathanathan PS, Ramanathan KV, et al. Interaction of aspirin with DPPC in the lyotropic, DPPC-aspirin-H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O membrane. *Mol Cryst Liq Cryst.* 1995;260(1):611–21. <https://doi.org/10.1080/10587259508038734>
- Pereira-Leite C, Nunes C, Reis S. Interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with membranes: in vitro assessment and relevance for their biological actions. *Progr Lipid Res.* 2013;52(4):571–84. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.08.003>
- Flaten GE, Luthman K, Vasskog T, Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle-based barrier: 4. The effect of tensides, co-solvents and pH changes on barrier integrity and on drug permeability. *Eur J Pharm Sci.* 2008;34(2–3):173–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.04.001>
- Lee CK, Uchida T, Kitagawa K, Yagi A, Kim NS, Goto S. Relationship between lipophylicity and skin permeability of various drugs form an ethanol/water/lauric acid system. *Biol Pharm Bull.* 1994;17(10):1421–4. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1421>

20. Vashchenko OV, Kasian NA, Budianska LV. Comparative effects of stearic acid, calcium and magnesium stearates as dopants in model lipid membranes. *Funct Mater.* 2018;25(2):300–7. <https://doi.org/10.15407/FM25.02.300>
21. Krasnikova AO, Vashchenko OV, Kasian NA, Iermak IuL, Markevich MA. Thermodynamical parameters of phase transitions in model lipid membranes as a marker of membranotropic effects of antibiotics in generic drugs. *Biophysical Bulletin.* 2014;32(2):27–38. Available from: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/article/view/1589/1332> (In Russian)
22. Bottner M, Winter R. Influence of the local anesthetic tetracaine on the phase behavior and the thermodynamic properties of phospholipid bilayers. *Biophys J.* 1993;65(5):2041–6. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81254-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81254-2)
23. Toyran N, Severcan F. The effect of magnesium ions on vitamin D<sub>2</sub>-phospholipid model membrane interactions in the presence of different buffer media. *Talanta.* 2000;53(1):23–7. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00378-7](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00378-7)
24. Toyran N, Severcan F. Infrared spectroscopic studies on the dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer interactions with calcium phosphate: effect of vitamin D<sub>2</sub>. *Spectroscopy.* 2002;16(3):399–408. <https://doi.org/10.1155/2002/381692>
25. Toyran N, Severcan F. Competitive effect of vitamin D<sub>2</sub> and Ca<sup>2+</sup> on phospholipid model membranes: an FTIR study. *Chem Phys Lipids.* 2003;123(2):165–76. [https://doi.org/10.1016/s0009-3084\(02\)00194-9](https://doi.org/10.1016/s0009-3084(02)00194-9)
26. Ricci M, Oliva R, Del Vecchio P, Paolantoni M, Morresi A, Sassi P. DMSO-induced perturbation of thermotropic properties of cholesterol-containing DPPC liposomes. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes.* 2016;1858(12):3024–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.012>
27. Vashchenko OV, Budianska LV. Joint action of pharmaceuticals in model lipid membranes: calorimetric effects. *Biophysical Bulletin.* 2016;36(2):11–8. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2016-36-02> (In Russian)
28. Johansson ME, Nicklasson M. Investigation of the film formation of magnesium stearate by applying a flow-through dissolution technique. *J Pharm Pharmacol.* 1986;38(1):51–4. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1986.tb04466.x>
29. Drug-biomembrane interaction studies. The application of calorimetric techniques. Pignatello R, editor. New Delhi: Woodhead Publishing; 2013. 436 p.
30. Mavromoustakos TM. The use of differential scanning calorimetry to study drug-membrane interactions. In: Dopico AM, editor. *Methods in Membrane Lipids. Methods in Molecular Biology™*, vol. 400. Humana Press. 2007. p. 587–600. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-519-0\\_39](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-519-0_39)
31. Kasian NA, Vashchenko OV, Budianska LV, Brodskii RYe, Lisetski LN. Thermodynamics and kinetics of joint action of antiviral agent tilorone and DMSO on model lipid membranes. *Biochim Biophys Acta – Biomembranes.* 2019;1861(1):123–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.08.007>
32. Lvov JM, Mogilevskij LJ, Fejgin LA, Györgyi S, Ronto Gy, Thompson KK, et al. Structural parameters of phosphatidylcholine bilayer membranes. *Mol Cryst Liq Cryst.* 1986;133(1–2):65–73. <https://doi.org/10.1080/00268948608079561>
33. Nademi Y, Iranagh SA, Pour AY, Mousavi SZ, Modarress H. Molecular dynamics simulations and free energy profile of paracetamol in DPPC and DMPC lipid bilayers. *J Chem Sci.* 2014;126(3):637–47. <https://doi.org/10.1007/s12039-013-0556-x>
34. Digenis GA, Sandefer EP, Page RC, Doll WJ, Gold TB, Darwazeh NB. Bioequivalence study of stressed and nonstressed hard gelatin capsules using amoxicillin as a drug marker and gamma scintigraphy to confirm time and GI location of in vivo capsule rupture. *Pharm Res.* 2000;17(5):572–82. <https://doi.org/doi:10.1023/a:1007568900147>
35. Meyer MC, Straughn AB, Mhatre RM, Hussain A, Shah VP, Bottom CB, et al. The effect of gelatin cross-linking on the bioequivalence of hard and soft gelatin acetaminophen capsules. *Pharm Res.* 2000;17(8):962–6. <https://doi.org/10.1023/A:1007579221726>
36. Koynova R, Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochim Biophys Acta – Reviews on Biomembranes.* 1998;1376(1):91–145. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(98\)00006-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(98)00006-9)
37. Lewis RNAH, McElhaney RN. The mesomorphic phase behavior of lipid bilayers In: Yeagle PL, editor. *The structure of biological membranes.* 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2004. p. 53–72. <https://doi.org/10.1201/9781420040203>
38. Kasian NA, Vashchenko OV, Budianska LV, Brodskii RYe, Lisetski LN. Cooperative domains in lipid membranes: size determination by calorimetry. *J Therm Anal Calorim.* 2019;136(2):795–801. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7695-8>
39. Tomassetti M, Catalani A, Rossi V, Vecchio S. Thermal analysis study of the interactions between acetaminophen and excipients in solid dosage forms and in some binary mixtures. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;37(5):949–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.10.008>

40. Patel S, Patel M, Kulkarni M, Patel MS. DE-INTERACT: A machine-learning-based predictive tool for the drug-excipient interaction study during product development—Validation through paracetamol and vanillin as a case study. *Int J Pharm.* 2023;637:122839. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122839>
41. Chayka LA, Povolotskaya VA, Lisetskiy LN, Panikarskaya VD, Kostrova AA. Vliyanie parasetamola i ego kombinatsiy na termodinamicheskie harakteristiki membrannyih struktur [Effect of paracetamol and its combinations on thermodynamic characteristics of membrane structures]. *Pharmacom.* 1995;7:20–2 (In Russian)

#### КІНЕТИЧНІ БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ НОВОГО АНАЛЬГЕТИЧНОГО ПРЕПАРАТУ ПАРАЦЕТАМОЛ–ГЛЮКОЗАМІН

О. В. Ващенко<sup>1</sup>, О. А. Рубан<sup>2</sup>, І. В. Зупанець<sup>3</sup>, П. В. Ващенко<sup>1</sup>, О. І. Іванюк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут сцинтиляційних матеріалів НТК «Інститут монокристалів» НАН України, пр. Науки, 60, Харків, 61072, Україна;

<sup>2</sup> Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна;

<sup>3</sup> АТ «Фармак», вул. Кирилівська, 63, Київ, 04080, Україна

\*e-mail: [olga\\_v@isma.kharkov.ua](mailto:olga_v@isma.kharkov.ua)

Надійшла до редакції 12 липня 2023 р. Переглянута 17 грудня 2023 р.

Прийнята до друку 21 грудня 2023 р.

**Актуальність.** Міжкомпонентні взаємодії у фармпрепаратах можуть відігравати важливу роль у вивільненні лікарської речовини, її проникненні крізь мембрану та мембранотропній дії. Таким чином, новітні препарати потребують перевірки їх біофармацевтичних характеристик. Розроблений новий анальгетичний препарат на основі парацетамолу (Actimask® Acetaminoprofen) та гепатопротектору N-ацетил-D-глюкозаміну показав підвищену безпечність та підсилення анальгетичного ефекту (Ruban O., 2022). Мультибішарові ліпідні мембрани було обрано як перспективне тестове середовище завдяки їх встановленій доречності та чутливості при вивченні мультикомпонентних взаємодій лікарських речовин з мембраною. Це створило основу для кінетичного підходу, який дозволяє виявляти біофармацевтичні взаємодії у модельному мембранному середовищі.

**Метою роботи** було виявлення змін вивільнення парацетамолу з нового препарату парацетамол-глюкозамін та його проникнення крізь мембрану, а також оцінка придатності розроблюваного підходу до моніторингу біофармацевтичних взаємодій у мембранному середовищі.

**Матеріали і методи.** Мультибішарові мембрани L- $\alpha$ -диміристоїлфосфатидилхоліну були використані як біоміметичне тестове середовище. Метод диференціальної скануючої калориметрії був застосований для моніторингу кінетики взаємодії лікарських речовин з мембраною.

**Результати.** Желатин як складова Actimask® підвищує характерний час дифузії парацетамолу майже втричі, але не впливає на його рівноважний розподіл у мембрану. Глюкозамін індивідуально не має вираженого мембранотропного ефекту за умов експерименту, втім у комбінації з желатином суттєво зменшує рівноважний розподіл парацетамолу у мембрану, майже не впливаючи на його дифузію. Повний набір компонентів препарату підвищує мембранотропний ефект на 34% у порівнянні з індивідуальним парацетамолом.

**Висновки.** Глюкозамін та желатин можуть впливати як на кінетичні, так і на рівноважні параметри взаємодії парацетамолу з ліпідною мембраною, тоді як повний набір компонентів препарату підвищує ефект парацетамолу, що добре корелює з попередньо встановленим підсиленням анальгетичного ефекту препарату. Розроблений підхід дозволяє чітко відстежувати вивільнення лікарської речовини та її проникнення крізь мембрану у залежності від набору компонентів препарату. Загалом отримані результати показують придатність даного підходу для застосування у доклінічних дослідженнях фармпрепаратів.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** наноструктуровані матеріали; модельні ліпідні мембрани; парацетамол; N-ацетил-D-глюкозамін; біофармацевтичні взаємодії; диференціальна скануюча калориметрія.

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-04>

UDC 577.3.01; 577.38; 577.3.001.57

## NEW PROMISING AGENTS AGAINST COPD AND ASTHMA AMONG THE AMIDES OF 1-OXO-3-PHENYL-ISOCHROMAN-6-CARBOXYLIC ACID

Alex Nyporko<sup>1</sup>, Olga Tsymbalyuk<sup>1</sup>, Ivan Voiteshenko<sup>1</sup>, Sergiy Starosyla<sup>2</sup>,  
Mykola Protopopov<sup>3</sup>, Volodymyr Bdzhola<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Taras Shevchenko National University of Kyiv, 64/13 Volodymyrska St., Kyiv, 01601, Ukraine;

<sup>2</sup> Receptor.AI Inc., 20–22 Wenlock Road, London, N1 7GU, United Kingdom;

<sup>3</sup> Chemspace LLC, 85, office 1 Winston Churchill St., Kyiv, 02094, Ukraine;

<sup>4</sup> Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine  
e-mail: [a\\_nyporko@knu.ua](mailto:a_nyporko@knu.ua)

Submitted December 3, 2023; Revised December 12, 2023;

December 14, 2023

**Background:** Bronchodilators, which are compounds that can relax airway smooth muscle, are perhaps the most important component of combination therapy for chronic obstructive pulmonary disease, one of the most common non-communicable diseases in the world, which is the second most lethal disease after cardiovascular disease. Unfortunately, current clinical bronchodilators, whose activity is mediated by their interaction with muscarinic acetylcholine receptors, have side effects (up to myocardial infarction) due to their cross-affinity for different types of these receptors, including those prevalent in the heart muscle.

**Objectives:** The aim of this work is to search/develop compounds — effective bronchodilators capable of selectively inhibiting type 3 muscarinic acetylcholine receptors (M<sub>3</sub> receptors), predominantly present in smooth muscles and not characteristic of cardiomyocytes.

**Materials and Methods:** High-throughput virtual screening of a collection of 150,000 compounds was conducted on the spatial structure of the M<sub>3</sub> receptor, reconstructed in our previous studies. The effect of substances on contractile activity was investigated using tensometry in isometric mode on multicellular tracheal preparations. Antagonistic activity and type of inhibition were determined against the background of acetylcholine application (concentration range 10<sup>-10</sup>–10<sup>-3</sup> M). To establish the affinity value of the compound-antagonist, the Schild regression equation was used.

**Results:** Based on virtual screening data, a series of compounds — amides of 1-oxo-3-phenyl-iso-chroman-6-carboxylic acid — were selected for biological testing. For two of these compounds (Compounds 1 and 7), the ability to selectively inhibit M<sub>3</sub> receptors was demonstrated. Specifically, the affinity value pK<sub>B</sub> for Compound 1 was 7.28 ± 0.70, with an IC<sub>50</sub> of 5.25 · 10<sup>-8</sup> M. A critically important advantage of this compound is its ability, at equal concentrations, to more effectively inhibit signal transmission through M<sub>3</sub> receptors compared to ipratropium bromide — a clinical cholinergic receptor inhibitor.

**Conclusions:** The sufficient effectiveness of inhibition and significantly increased selectivity of the studied compounds specifically towards M<sub>3</sub> receptors provide strong grounds to consider these compounds as promising precursors of new generation cholinolytic drugs with targeted action on M<sub>3</sub>-type cholinergic receptors.

**KEY WORDS:** chronic obstructive pulmonary disease (COPD); acetylcholine receptor; virtual screening; molecular docking; tensometry; selective M<sub>3</sub> antagonists.

**In cites:** Nyporko A, Tsymbalyuk O, Voiteshenko I, Starosyla S, Protopopov M, Bdzhola V. New promising agents against COPD and asthma among the amides of 1-oxo-3-phenyl-iso-chroman-6-carboxylic acid. *Biophysical Bulletin*. 2023;50:36–47. <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2023-50-04>

**Open Access.** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

© Nyporko A., Tsymbalyuk O., Voiteshenko I., Starosyla S., Protopopov M., Bdzhola V., 2023.

In the human respiratory tract, M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> type cholinergic receptors play a direct role in regulating the lumen of the bronchial tree [1–4]. The physiological functions of M<sub>2</sub> cholinergic receptors, located in smooth muscle cells and postganglionic parasympathetic neurons, are to limit  $\beta_2$ -adrenoreceptor-mediated relaxation of smooth muscles by reducing intracellular cAMP concentration and to suppress the release of the neurotransmitter acetylcholine from nerve endings of postganglionic neurons [1, 5, 6]. Although M<sub>2</sub> type receptors significantly outnumber M<sub>3</sub> cholinergic receptors in smooth muscle cell membranes, the latter are functionally the main type of acetylcholine receptors that facilitate their contraction and narrowing of the respiratory tract lumen, as well as regulate the secretory activity of mucosal glands [1, 2, 7–9].

Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) are among the most common non-infectious diseases worldwide. According to data from the Global Asthma Network and the Global Initiative for Asthma, asthma affects 1 to 18% of the population in various countries, with a total global number of patients exceeding 300 million; a concerning global trend is the annual increase in patients diagnosed with asthma by 2.9% [9]. Asthma is characterized by transient airflow limitation in the airways, as well as airway hyperresponsiveness and sometimes remodeling of the airway wall tissues; these symptoms are also primary in COPD.

Pharmacological drugs used in the treatment of asthma and COPD are divided into several groups: long-acting  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists (LABA), short-acting  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists (SABA), long-acting muscarinic acetylcholine receptor antagonists (LAMA), short-acting muscarinic acetylcholine receptor antagonists (SAMA), as well as inhaled and oral corticosteroids.

Currently, the most commonly used drug in Ukraine for COPD and bronchial asthma with M-cholinolytic activity is ipratropium bromide [10, 11]. Like atropine, ipratropium is a competitive antagonist of muscarinic acetylcholine receptors. It has gained widespread use in the therapy of asthma and COPD, as unlike atropine, it does not cross the blood-brain barrier and is poorly absorbed through the gastrointestinal tract walls. Ipratropium is recommended by the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2009 (according to the Global strategy for diagnosis, management, and prevention of COPD) for four times daily inhalation use by COPD patients as a short-acting muscarinic antagonist (SAMA), with the maximum effect achieved within 60–90 minutes and the duration of therapeutic effect lasting 4–6 hours.

However, the optimal strategy for the therapy of obstructive phenomena in the airways with cholinolytic drugs (more precisely, drugs with properties of long-acting muscarinic antagonist — LAMA) involves the use of M<sub>3</sub>-selective antagonists [1, 12]. Current COPD therapy protocols (USA, EU countries) and asthma include the use of such LAMA: tiotropium (recommended at a dose of 5 or 18  $\mu\text{g}$  depending on the nebulizer functioning method, once daily) and aclidinium (recommended at a dose of 400  $\mu\text{g}$  twice daily), glycopyrronium (recommended at a dose of 50  $\mu\text{g}$  once daily), and umeclidinium (for COPD treatment and potential use in asthma treatment, recommended at a dose of 62.5  $\mu\text{g}$  once daily) [2, 13]. According to a meta-analysis [14], for newer LAMA drugs (aclidinium, glycopyrronium, and glycopyrronium), no significant therapeutic advantages were found compared to the earlier tiotropium bromide (the only LAMA drug for COPD therapy until 2012).

Thus, currently, the active substance in drugs for the therapy of uncontrolled asthma is tiotropium bromide — a structural analog of ipratropium bromide, which is a functional antagonist of M<sub>3</sub> cholinergic receptors. This is because, although it binds to M<sub>2</sub> receptors, it dissociates from these significantly faster than from M<sub>3</sub> type receptors. Compared to ipratropium, tiotropium bromide has lower oral bioavailability and systemic side effects, and an extended half-life in patient's body [15–17]. However, the use of tiotropium bromide for the

therapy of stable asthma may be ineffective due to insufficient drug dosage, while increasing the dosage can lead to side effects [1, 18].

Therefore, the aim of our study was the directed search and biological testing of low-molecular-weight selective inhibitors of M<sub>3</sub> type muscarinic acetylcholine receptors.

## MATERIALS AND METHODS

### *Virtual Screening*

The predicted structure of the M<sub>3</sub>-type muscarinic acetylcholine receptor [19] was used as a target for virtual screening. Two binding sites were identified. Binding site 1 (orthosteric) and binding site 2 (allosteric) utilizing the ICM Pocket Finder tool [20]. The first site is a combined pocket from the area located in a fold formed by helically twisted transmembrane domains, with which acetylcholine binds, as well as the area located higher, between the loops that bind the transmembrane domains. The second is on the reverse, intracellular part, formed by transmembrane domains. The orthosteric site has better characteristics than the allosteric one (larger volume of 1013.7 Å<sup>3</sup> compared to 461.8 Å<sup>3</sup> for the allosteric site, aromatic factor of 0.15 compared to 0, and drug-like index (DLID) [21] of 1.35 compared to 0.13). After detailed analysis and determination of the parameters of these sites, the orthosteric site was chosen for docking studies.

Virtual screening of the Department of Medicinal Chemistry Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine compounds collection (150,000 compounds) was conducted utilizing AutoDock 4.2 [22] molecular docking software with previously reported parameters and protocols [23]. 3,000 top-scored compounds (2% of all screened compounds) were selected according to AutoDock score for visual inspection and cherry-picking.

The BIOVIA Discovery Studio Visualizer [24] was utilized for visual inspection and ligand-target interaction analysis of top scored compounds. The parameters of the visualizer related to the construction of molecular bonds were used by default. The criteria for selecting compounds for pharmacological tests were as follows: 1. Compounds should bind to the acetylcholine-binding site; 2. Compounds should also bind to the subpocket above the acetylcholine-binding site for enhanced affinity and selectivity; 3. There must be at least one hydrogen bond.

### *Functional pharmacological studies of compound activity in vitro*

Testing the effect of muscarinic acetylcholine receptor inhibitor substances was carried out on the contractile activity of the smooth muscles of the trachea using male Wistar rats (weighing within 230–250 g). Rats were euthanized under ether anesthesia, and all animal manipulations were conducted in accordance with the International Convention on the Work with Animals and the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals from Cruel Treatment' (protocol of the meeting of the bioethics commission of the National Scientific Center 'Institute of Biology and Medicine' No. 3 dated May 2, 2019).

The study of contractile activity was conducted using tensometry in isometric mode on multicellular tracheal preparations, which were rings with an intact mucosal lining containing at least four cartilaginous rings. For the experiments, tracheal fragments from the beginning of the bifurcation to 1–1.5 cm above the bifurcation were used.

In the experiments, Krebs solution was used (mM): 120.4 NaCl; 5.9 KCl; 15.5 NaHCO<sub>3</sub>; 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1.2 MgCl<sub>2</sub>; 2.5 CaCl<sub>2</sub>; 11.5 glucose; the pH of the solution was 7.4. Tracheal rings were placed in a working chamber (volume 2 ml) bubbled with an oxygenated gas mixture of Krebs solution (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>, flow rate — 5 ml/min), and thermostated at 37°C. The tracheal preparations were given a passive tension of 10 mN and left for 1 hour; the study began

after recording several reproducible contractile reactions to the application of hyperkalemic solution and acetylcholine ( $10^{-6}$  M). The contractile activity was investigated using a capacitive force sensor; the amplified signal was recorded using an ADC.

Preliminary screening of compounds for their ability to inhibit muscarinic cholinergic receptors was conducted by recording contractile responses of tracheal preparations to the application of acetylcholine ( $10^{-5}$  M) under the condition of prior action of the tested compounds (at a concentration of  $10^{-4}$  M) for 10 minutes.

To study the antagonistic activity of muscarinic cholinergic receptor antagonists (ipratropium bromide and tested substances), contractile responses of tracheal preparations to the application of acetylcholine at a concentration of  $10^{-4}$  M were recorded under cumulative increases in antagonist concentrations ( $10^{-10}$ – $10^{-5}$  M, with the antagonist's prior action time of 10 minutes) and concentration-effect curves were constructed, from which the  $IC_{50}$  value was determined; the maximum contractile response (100%) was considered as the contraction to the application of acetylcholine without an antagonist.

To confirm the competitive type of inhibition by ipratropium bromide and tested substances, as well as to study their functional antagonism, concentration-effect curves of acetylcholine were recorded (acetylcholine concentration range  $10^{-10}$ – $10^{-3}$  M). Subsequently, the Schild regression equation was used to determine the affinity of the compound-antagonist. According to the Schild method, the antagonist-induced parallel shift of the concentration-effect curves was determined as the ratio of equieffective concentrations (CR) of the agonist in control and in the presence of an antagonist. From the Schild plots, the functional antagonism index (affinity index of the competitive antagonist)  $pK_B$  and the tangent of the slope angle were determined [25–27].

To study the cellular mechanisms of action of the compounds, contractile responses of the trachea to the application of the selective mAChR<sub>3</sub> agonist cevimeline ( $10^{-4}$  M), effectors of adrenoreceptors (adrenaline,  $10^{-5}$  M; propranolol,  $10^{-5}$  M; isoproterenol,  $10^{-5}$  M), and nicotinic cholinergic receptors (nicotine,  $10^{-4}$  M), blocker of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive (IP<sub>3</sub>) Ca<sup>2+</sup> channels of the sarcoplasmic reticulum (2-APB,  $10^{-4}$  M), and phospholipase C inhibitor (U-73122,  $10^{-6}$  M) were recorded.

All compounds under study were initially dissolved in DMSO and introduced into the smooth muscle preparations in such a way that the final concentration of DMSO was 0.1%. Additionally, all experiments were conducted in the presence of DMSO in the bathing solution at a concentration of 0.1%.

Experimental data were analyzed using Origin Pro 2018 software. The samples were tested for their adherence to normally distributed populations using the Shapiro-Wilk criterion. To determine significant differences between the mean values of the samples, a paired t-test was used; multiple comparisons were conducted using one-way analysis of variance (ANOVA). In all cases, results were considered significant if  $p < 0.05$ . The significance of data approximation by a linear function was analyzed using Fisher's F-criterion; the coefficients of determination ( $R^2$ ) were not less than 0.9. Results are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM),  $n$  – number of experiments.

## RESULTS AND DISCUSSION

For pharmacological testing *in vitro* on multicellular smooth muscle preparations of rat tracheal rings, seven most promising compounds — amides of 1-oxo-3-phenyl-isochroman-6-carboxylic acid (1–7, Table 1) with predicted cholinolytic activity were selected through preliminary *in silico* screening. As a target for screening, the spatial structure of the M<sub>3</sub> type cholinergic receptor, reconstructed in our previous studies [19], were used. Structure of these compounds are presented in Table 1.

Table 1. Structures and physico-chemical properties of the studied amides of 1-oxo-3-phenyl-isochroman-6-carboxylic acid

Compound	Structure
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	

In the first series of experiments, the reaction of smooth muscle preparations (SMP) of the trachea to the application of acetylcholine ( $10^{-5}$  M) was tested under the condition of prior

action of the tested compounds (all at a concentration of  $10^{-4}$  M) for 10 minutes. Thus, two compounds were identified with the ability to suppress acetylcholine-induced contractions, identified as **1** and **7** (Fig. 1).

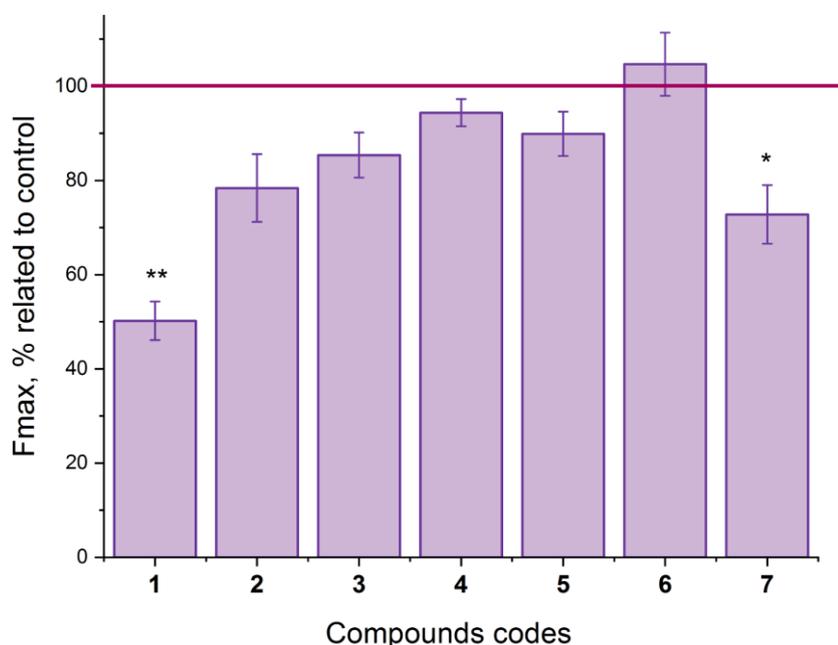


Fig. 1. Changes in the amplitude ( $F_{\max}$ ) of acetylcholine-induced ( $10^{-5}$  M) contractions of rat tracheal preparations by compounds (used at a concentration of  $10^{-4}$  M, pre-incubation time 10 min).

Control values were taken as 100% ( $n = 7$ ).

\*\* —  $p < 0.01$  and \* —  $p < 0.05$  — significant difference compared to control.

Spatial structures of the corresponding complexes of active compounds are depicted in Fig. 2. Both compounds interact with the  $M_3$  cholinergic receptor in the same manner. The 1-oxo-3-phenyl-isochroman moiety interacts within the acetylcholine binding site, specifically forming a series of hydrophobic interactions with Tyr148, Trp503, Tyr506, Tyr529, Cys532, and a hydrogen bond with Asn507. The NH of amide group forms two hydrogen bonds with Tyr148 and Tyr506. The *o*-tolyl group of compound **7** engages in hydrophobic interactions with Ile222 and Leu225. Methyl *o*-benzoate group of compounds **1** has additional hydrophobic interactions with Leu144 and Tyr148, as well as hydrogen bonds with Tyr148, Ile222, and Tyr529.

In the subsequent series of experiments, acetylcholine-induced contractions of rat tracheal preparations were recorded under the action of selected compounds **1** and **7** (all used at a concentration of  $10^{-4}$  M) against the background of prior incubation of SMP with the known cholinergic receptor antagonist ipratropium (used at a concentration of  $10^{-6}$  M). Since the tested compounds did not affect the baseline tension and contractile response of SMP in the presence of ipratropium, it can be asserted that these substances are tropic to muscarinic cholinergic receptors.

The mentioned compounds did not affect the SMP responses to the application of the nicotinic cholinergic receptor agonist nicotine (used concentration  $10^{-6}$  M), supporting the hypothesis of the selective action of the tested substances specifically on muscarinic acetylcholine receptors [21].

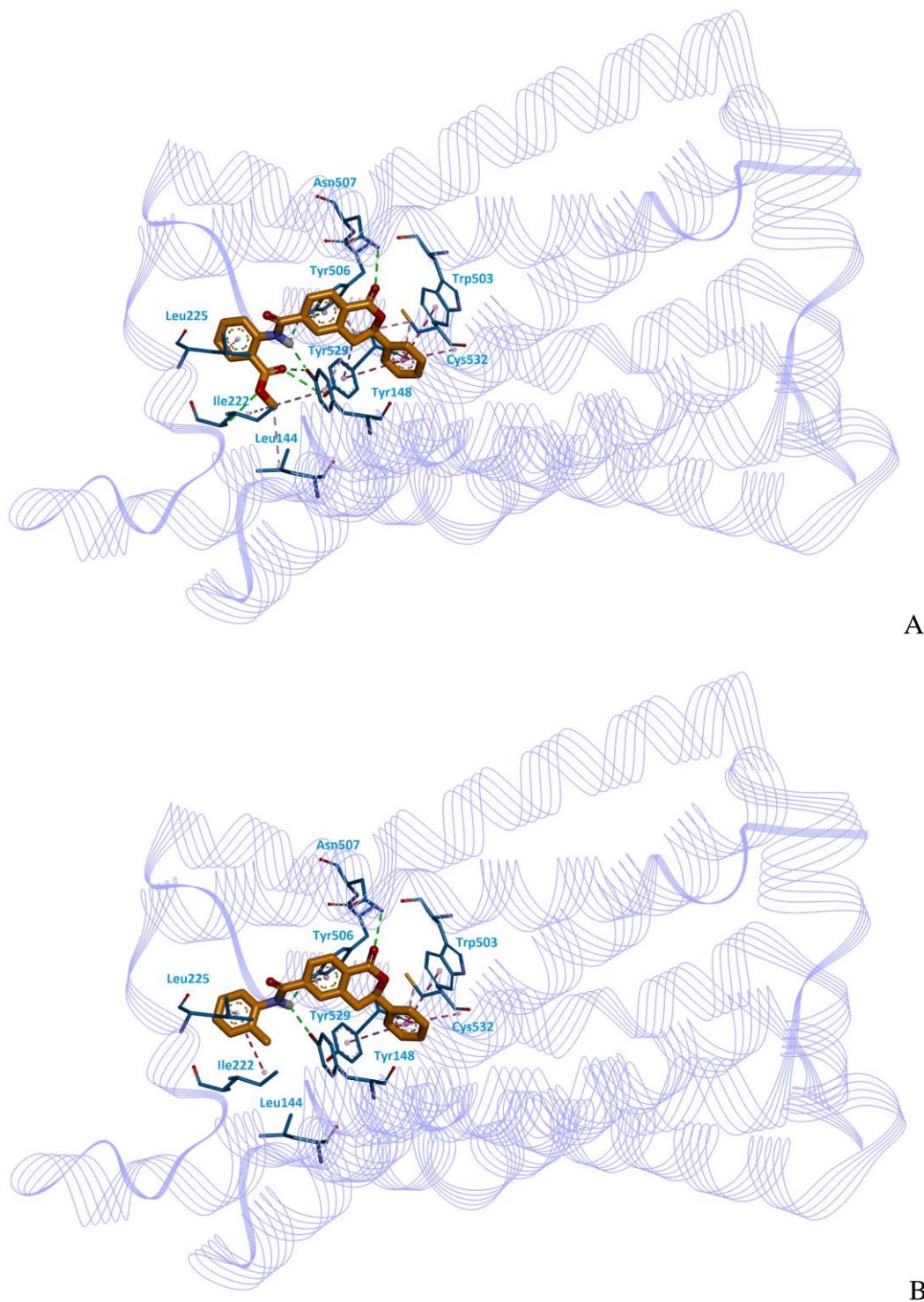


Fig. 2. Molecular complexes of M<sub>3</sub> cholinergic receptor with compound **1** (A) and compound **7** (B) obtained by molecular docking. Hydrogen bonds are shown by the green dotted lines, hydrophobic interactions are indicated by magenta dotted lines.

It was also established that both compounds and the known non-selective inhibitor of muscarinic cholinergic receptors, ipratropium bromide (in all cases used at a concentration of  $10^{-6}$  M, with a pre-incubation duration of 10 minutes in the presence of the tested substance), could inhibit the contractions of SMP of the trachea activated by the selective M<sub>3</sub> cholinergic

receptor agonist cevimeline (fixed concentration of  $10^{-4}$  M). The greatest inhibitory properties against  $M_3$  cholinergic receptors were observed for compound **7** — under these conditions, cevimeline-induced contraction was  $24.5 \pm 3.6\%$  relative to the control, taken as 100% ( $n = 7$ ,  $p < 0.001$ ). For comparison, a similar effect on cevimeline-induced SMP tracheal contractions for ipratropium bromide was registered, a compound that is the active ingredient in medicinal products for the therapy of bronchial asthma and COPD. It was found that ipratropium bromide at a concentration of  $10^{-6}$  M causes an average inhibition of cevimeline-induced contraction to  $63.2 \pm 5.1\%$  relative to the control, taken as 100% ( $n = 7$ ,  $p < 0.01$ ).

Subsequently, for the compound **7**, 'acetylcholine concentration-effect' curves were registered and analyzed, the type of inhibition, affinity indicators, and  $IC_{50}$  were determined. It was found that the slope of the Schild regression line ( $0.88 \pm 0.12$ , coefficient of determination  $R^2 = 0.98$ ) (Fig. 3, 4) indicates a competitive mechanism of action of this substance. The affinity value of this compound  $pK_B$  was  $7.28 \pm 0.70$  and  $IC_{50} = 5.25 \cdot 10^{-8}$  M.

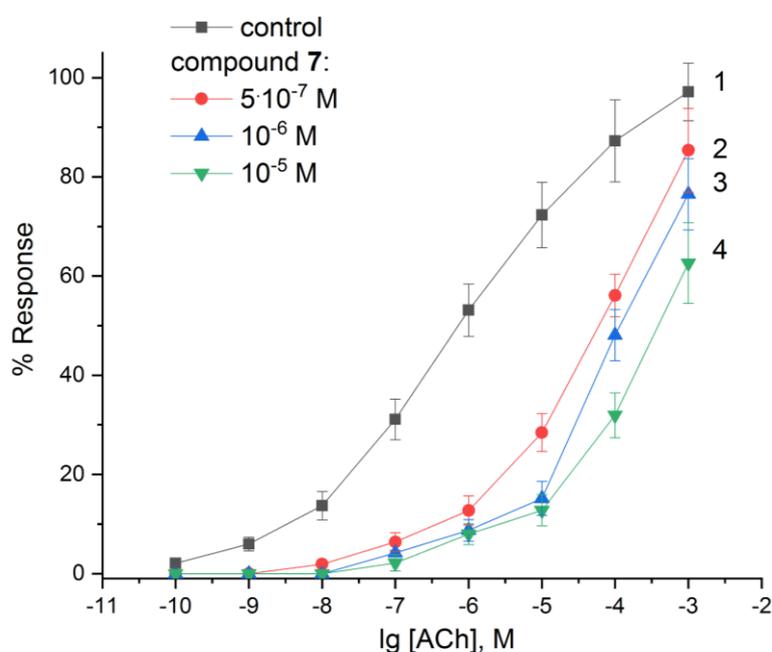


Fig. 3. 'Acetylcholine concentration-effect' curves in the presence of compound **7** for the activation of smooth muscle contractions of rat trachea: curve 1 — control (concentration range  $10^{-10}$ – $10^{-3}$  M), curves 2–4 — against the background of **7** at concentrations of  $5 \cdot 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M, and  $10^{-5}$  M, respectively. The amplitude of contractions under the action of antagonists is recalculated in % compared to acetylcholine-induced contraction in control ( $10^{-4}$  M), taken as 100%. Data are presented as  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .

It has also been established that compound **7** does not significantly affect the nicotinic cholinergic receptors and adrenergic receptors of the respiratory tract in rats. Using a phospholipase C inhibitor (U-73122) and blockers of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive (2-APB) and ryanodine-sensitive (caffeine)  $Ca^{2+}$  channels of the sarcoplasmic reticulum, it was demonstrated that the aforementioned compounds act on the intracellular signaling cascade through  $M_3$  type muscarinic cholinergic receptors [28–31].

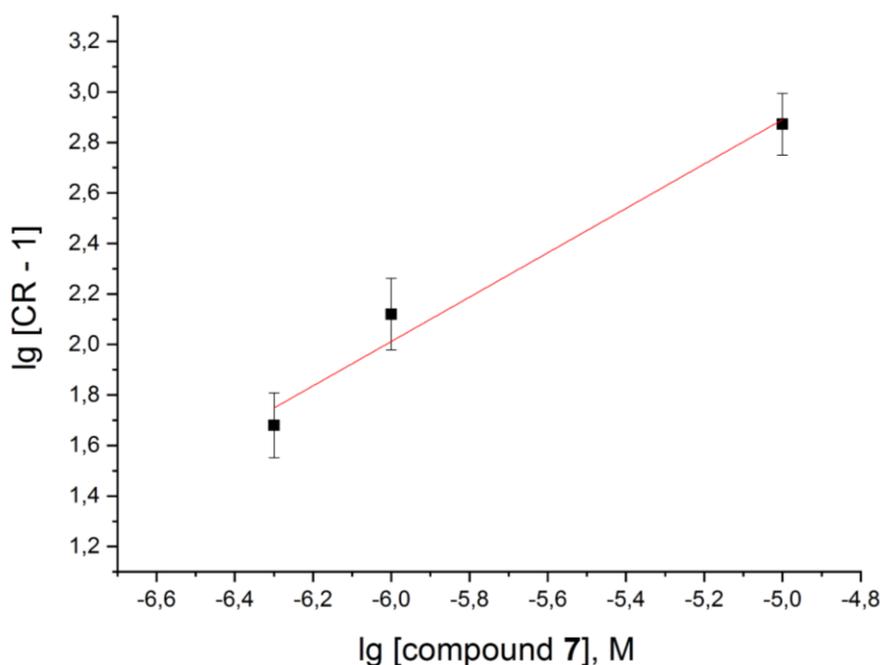


Fig. 4. Schild plot for the action of compound 7. Data are presented as  $M \pm SEM$ ,  $n = 7$ .

Previously, we established [19] that for the known non-selective competitive antagonist of muscarinic cholinergic receptors, ipratropium bromide, the slope of the Schild regression line was  $0.79 \pm 0.07$  (coefficient of determination  $R^2 = 0.99$ ), and the affinity value  $pK_B$  was  $9.14 \pm 0.62$  with an  $IC_{50}$  of  $7.24 \cdot 10^{-10}$  M. Therefore, compound 7 has a lower affinity and is characterized by higher  $EC_{50}$  values compared to ipratropium bromide. However, a critically important advantage of compound 7 is its ability, at equal concentrations, to more effectively inhibit signal transmission through  $M_3$  cholinergic receptors compared to ipratropium bromide.

## CONCLUSIONS

Biological testing was conducted on smooth muscle preparations (SMP) of the trachea for compounds in the group of amides of 1-oxo-3-phenyl-isochroman-6-carboxylic acid with predicted inhibitory activity towards mAChRs: their pharmacological effects and parameters were studied. It was found that the compound 7 effectively inhibits (with an average  $IC_{50}$  value of  $5.25 \cdot 10^{-8}$  M) and at equal concentrations significantly more inhibits signal transduction specifically through  $M_3$  cholinergic receptors compared to ipratropium bromide, without having a significant effect on  $M_2$  cholinergic receptors. Therefore, there are all reasons to consider these compounds as promising precursors of new generation cholinolytic drugs with targeted action on  $M_3$  cholinergic receptors.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The study was funded by the National Research Foundation of Ukraine, Project 2020.01/0543.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors report that there is no conflict of interest.

## Authors' ORCID ID

Alex Nyporko  <https://orcid.org/0000-0003-1664-6837>

Olga Tsymbalyuk  <https://orcid.org/0000-0002-4524-7627>

Ivan Voiteshenko  <https://orcid.org/0000-0003-2434-9218>  
 Sergiy Starosyla  <https://orcid.org/0000-0002-5103-0635>  
 Mykola Protopopov  <https://orcid.org/0000-0002-2716-4844>  
 Volodymyr Bdzhola  <https://orcid.org/0000-0003-0315-450X>

## REFERENCES

1. Cavazos Galván M. Asthma in emergency department. Guidelines, physicians and patients. *Rev Alerg Mex.* 2006 Jul-Aug;53(4):136–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17137189/>
2. Zeng Z, Mukherjee A, Varghese AP, Yang XL, Chen S, Zhang H. Roles of G protein-coupled receptors in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2020 Mar 28;26(12):1242–61. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i12.1242>
3. Ilyaskina OS, Lemoine H, Bünemann M. Lifetime of muscarinic receptor–G-protein complexes determine coupling efficiency and G-protein subtype selectivity. *Proc Natl Acad Sci.* 2018 May 8;115(19):5016–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715751115>
4. Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, Meqdad MA, Antypas RB, Lingireddy A, et al. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol Genomics.* 2018 Jan 1;50(1):1–9. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00062.2017>
5. Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Curr Pharm Des.* 2006 Oct 1;12(28):3573–81. <https://doi.org/10.2174/138161206778522056>
6. Tobin G, Giglio D, Lundgren O. Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacol.* 2009 Mar;60(1):3–21. Available from: <https://europepmc.org/article/med/19439804>
7. Lee HW, Park J, Jang EJ, Lee CH. Comparisons of exacerbations and mortality among LAMA/LABA combinations in stable chronic obstructive pulmonary disease: systematic review and Bayesian network meta-analysis. *Respir Res.* 2020 Dec 25;21(1):310. <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01540-8>
8. Kruse AC, Kobilka BK, Gautam D, Sexton PM, Christopoulos A, Wess J. Muscarinic acetylcholine receptors: novel opportunities for drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Jul 6;13(7):549–60. <https://doi.org/10.1038/nrd4295>
9. Rhee CK, Yoshisue H, Lad R. Fixed-Dose Combinations of Long-Acting Bronchodilators for the Management of COPD: Global and Asian Perspectives. *Adv Ther.* 2019 Mar 11;36(3):495–519. <https://doi.org/10.1007/s12325-019-0893-3>
10. Abrams P, Andersson K, Buccafusco JJ, Chapple C, de Groat WC, Fryer AD, et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *Br J Pharmacol.* 2006 Jul 29;148(5):565–78. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706780>
11. Eglén RM. Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology. In: King FD, Lawton G, editors. *Progress in Medicinal Chemistry.* Vol. 43. Elsevier; 2005. p. 105–36. [https://doi.org/10.1016/s0079-6468\(05\)43004-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6468(05)43004-0)
12. Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes in airways. *Life Sci.* 1993 Jan;52(5–6):521–7. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90310-y](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90310-y)
13. Miravittles M, Anzueto A, Jardim JR. Optimizing bronchodilation in the prevention of COPD exacerbations. *Respir Res.* 2017 Dec 20;18(1):125. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0601-2>
14. Eglén RM. Overview of Muscarinic Receptor Subtypes. In: *Muscarinic Receptors.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 3–28. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_1)
15. Gomes F, Cheng SL. Pathophysiology, Therapeutic Targets, and Future Therapeutic Alternatives in COPD: Focus on the Importance of the Cholinergic System. *Biomolecules.* 2023 Mar 5;13(3):476. <https://doi.org/10.3390/biom13030476>
16. Maqsood MH, Rubab K, Maqsood MA. The Role of Revefenacin in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Cureus.* 2019 Apr 10; 11(4):e4428. <https://doi.org/10.7759/cureus.4428>
17. Nadler LS, Rosoff ML, Hamilton SE, Kalaydjian AE, McKinnon LA, Nathanson NM. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. *Life Sci.* 1999 Jan;64(6–7):375–9. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00577-3](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00577-3)
18. Zaagsma J, Roffel AF, Meurs H. Muscarinic control of airway function. *Life Sci.* 1997 Feb;60(13–14):1061–8. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(97\)00048-9](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(97)00048-9)
19. Nyporko A, Tsybalyuk O, Voiteshenko I, Starosyla S, Protopopov M, Bdzhola V. Computer-aided design of muscarinic acetylcholine receptor M3 inhibitors: Promising compounds among trifluoromethyl containing hexahydropyrimidinones/thiones. *Mol Inform.* 2023 Aug 9;42(8–9). <https://doi.org/10.1002/minf.202300006>
20. Abagyan R, Raush E, Totrov M. ICM Manual v.3.9 [Internet]. Molsoft, LLC. [cited 2023 Nov 30]. Available from: <https://www.molsoft.com/icm>

21. Protopopov M V., Starosyla SA, Borovykov O V., Sapelkin VN, Bilokin Y V., Bdzholo VG, et al. Hit identification of CK2 inhibitors by virtual screening. *Biopolym Cell*. 2017 Aug 31;33(4):291–301. <https://doi.org/10.7124/bc.00095B>
22. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec 27;30(16):2785–91. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
23. Sheridan RP, Maiorov VN, Holloway MK, Cornell WD, Gao YD. Drug-like Density: A Method of Quantifying the “Bindability” of a Protein Target Based on a Very Large Set of Pockets and Drug-like Ligands from the Protein Data Bank. *J Chem Inf Model*. 2010 Nov 22;50(11):2029–40. <https://doi.org/10.1021/ci100312t>
24. Dassault Systèmes. BIOVIA Discovery Studio Visualizer [Internet]. Dassault Systèmes. 2020 [cited 2023 Nov 30]. Available from: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>
25. Tsymbaliuk OV, Naumenko AM, Skoryk MA, Nyporko OYu, Davidovska TL, Skryshevsky VA. Histamine- and nicotine-stimulated modulations of mechanic activity of smooth muscles in gastrointestinal tract at the impact of nanosized TiO<sub>2</sub> material. *Biopolym Cell*. 2016 Apr 30;32(2):140–9. <https://doi.org/10.7124/bc.000917>
26. Naumenko AM, Dmytrenko O V., Shapoval LM, Tsymbalyuk O V., Sagach VF, Davydovska TL. Effects of Injections of Nanostructured Titanium Dioxide into the Rat Medullary Nuclei Involved in Cardiovascular Control. *Neurophysiology*. 2018 Nov 18;50(6):409–14. <https://doi.org/10.1007/s11062-019-09772-1>
27. Naumenko AM, Shapoval LM, Nyporko AYU, Voiteshenko MI, Tsymbalyuk A V., Sagach VF, et al. Computer Simulation of Molecular Interaction Between Baclofen and the GABA<sub>B</sub> Receptor. *Neurophysiology*. 2017 Feb 1;49(1):2–7. <https://doi.org/10.1007/s11062-017-9623-0>
28. Luo L, Zhang G, Mao L, Wang P, Xi C, Shi G, et al. Group II muscarinic acetylcholine receptors attenuate hepatic injury via Nrf2/ARE pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2020 May;395:114978. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.114978>
29. Baroffio M, Crimi E, Bricchetto L, Zappi L, Rehder K, Brusasco V. Pre-junctional muscarinic autoreceptors in bovine airways. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Jan;180(1):45–51. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.10.007>
30. Naumenko AM, Nyporko AYU, Tsymbalyuk OV, Golius A, Shapoval LM, Davidovska TL. 3D reconstruction of a full-size GABA<sub>B</sub> receptor. *Neurophysiology*. 2015;47:364–75. <https://doi.org/10.1007/s11062-016-9544-3>
31. Aparici M, Carcasona C, Ramos I, Montero JL, Otal R, Ortiz JL, et al. Pharmacological Profile of AZD8871 (LAS191351), a Novel Inhaled Dual M<sub>3</sub> Receptor Antagonist/ $\beta_2$ -Adrenoceptor Agonist Molecule with Long-Lasting Effects and Favorable Safety Profile. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019 Jul;370(1):127–36. <https://doi.org/10.1124/jpet.118.255620>

## НОВІ ПЕРСПЕКТИВНІ ЗАСОБИ ПРОТИ ХОЗЛ ТА АСТМИ СЕРЕД АМІДІВ 1-ОКСО-3-ФЕНІЛІЗОХРОМАН-6-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ

Олексій Нипорко<sup>1</sup>, Ольга Цимбалюк<sup>1</sup>, Іван Войтешенко<sup>1</sup>, Сергій Старосила<sup>2</sup>, Микола Протопопов<sup>3</sup>, Володимир Бджола<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ, 01601, Україна;

<sup>2</sup> Receptor.AI Inc., буд. 20, поверх 22, вул. Венлок, Лондон, N1 7GU, Об'єднане Королівство;

<sup>3</sup> Chemspace LLC, вул. Вінстона Черчилля, 85, офіс 1, Київ, 02094, Україна;

<sup>4</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна  
e-mail: [a\\_nyporko@knu.ua](mailto:a_nyporko@knu.ua)

Надійшла до редакції 3 грудня 2023 р. Переглянута 12 грудня 2023 р.

Прийнята до друку 14 грудня 2023 р.

**Актуальність.** Бронходилататори — сполуки, здатні розслабляти гладеньку мускулатуру повітроносних шляхів, є чи найважливішим компонентом комбінованої терапії хронічного обструктивного захворювання легень — одного з найбільш поширених у світі неінфекційних захворювань, що займає друге місце за летальністю після серцево-судинних захворювань. На жаль, сучасні клінічні бронходилататори, чия активність опосередкована їх взаємодією з мускариновими рецепторами ацетилхоліну, мають побічні ефекти (до інфаркту міокарда) внаслідок їх перехресної спорідненості до різних типів цих рецепторів, зокрема, і до тих, що розповсюджені в серцевому м'язі.

**Мета роботи:** пошук/розробка сполук — ефективних бронходилататорів, здатних селективно інгібувати мускаринові рецептори ацетилхоліну типу 3 (M<sub>3</sub>-рецептори), які представлені переважно в гладеньких м'язах і не характерні для кардіоміоцитів.

**Матеріали і методи.** Високопродуктивний віртуальний скринінг колекції 150000 сполук було здійснено щодо просторової структури М<sub>3</sub>-рецептора, реконструйованого в наших попередніх дослідженнях. Вплив речовин на скорочувальну активність досліджували методом тензометрії у ізометричному режимі на мультиклітинних препаратах трахеї. Антагоністичну активність і тип інгібування визначали на фоні аплікування ацетилхоліну (діапазон концентрацій 10<sup>-10</sup>–10<sup>-3</sup> М). Для встановлення величини афінності сполуки-антагоніста використовували рівняння регресії Шілда.

**Результати.** За даними віртуального скринінгу було обрано для біологічного тестування ряд сполук — амідів 1-оксо-3-феніл-ізохроман-6-карбонової кислоти. Для двох із них (сполуки 1 і 7) було продемонстровано здатність селективно інгібувати М<sub>3</sub>-рецептори. Зокрема, велична афінності рK<sub>v</sub> для сполуки 1 становила 7,28±0,70, а IC<sub>50</sub>=5,25·10<sup>-8</sup> М. Надзвичайно важливою перевагою цієї сполуки є її здатність за однакових концентрацій достовірно ефективніше пригнічувати проведення сигналу через М<sub>3</sub>-рецептори порівняно з іпратропієм бромідом — клінічним інгібітором холінорецепторів.

**Висновки.** Достатня ефективність інгібування і значно підвищена селективність досліджених сполук саме стосовно М<sub>3</sub>-рецепторів дають всі підстави вважати зазначені сполуки перспективними попередниками холінолітичних препаратів нового покоління зі спрямованою дією на холінорецептори М<sub>3</sub>-типу.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ); мускариновий ацетилхоліновий рецептор; віртуальний скринінг; молекулярний докінг; тензометрія; селективні М<sub>3</sub>-антагоністи.

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається електронний варіант статті (MS Word 2007 і вище) українською або англійською мовою через сайт журналу <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk> з направленням установи і експертним висновком у вигляді відсканованих файлів.

Текст набирається на аркушах формату А4 через один інтервал. Використовується шрифт Times New Roman 12 pt, вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху – 3,5 см, знизу – 2 см. Математичні та хімічні символи вводяться до тексту статті за допомогою редактора MathType або Microsoft Equation. Рисунки з роздільною здатністю не менше ніж 300 dpi у форматі \*.jpg, \*.jpeg, \*.png вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки слід розміщувати в межах таблиці з прозорими зовнішніми границями у першому рядку, підпис та коментарі до рисунку – у другому рядку таблиці. Графіки будуються у програмних пакетах, призначених для обробки і візуалізації наукових даних: Origin, Mathcad тощо. Використання офісного пакету MS Excel для побудови графіків не допускається. Цифри і підписи на осях та надписах повинні мати шрифт 9 pt. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 10 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1. Якщо стаття написана українською мовою, підписи до рисунків і таблиць дублюються англійською мовою.

На першій сторінці зверху на першому рядку в лівому верхньому куті наводиться УДК (курсив, 11 pt). Після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (великі літери, прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка набираються ініціали, прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку розміщуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота, адреса електронної пошти автора – контактної особи (курсив, 10 pt, вирівнювання по центру). Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число – цифрами, місяць – прописом, рік – цифрами (шрифт прямий, 10 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку вміщується дата прийняття статті до друку (заповнюється редколегією).

Після пропуску одного рядка вміщуються два реферати (українською та англійською мовами). Реферат мовою статті розміщується першим. Перед другим рефератом з нового рядка пишеться назви статі (великими літерами, шрифт прямий, 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), назви організацій та їх адреси (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Реферат повинен бути структурованим та містити наступні частини з заголовками: **Актуальність, Мета роботи, Матеріали і методи, Результати, Висновки**, які починаються з нового рядка. Слова “Реферат” і “Abstract” не пишуться. Заголовки структурних частин пишуться напівжирним шрифтом, після заголовка ставиться крапка. Текст реферату складає не менше 1800 та не більше 2000 фонетичних символів, тобто без проміжків між словами; прямий шрифт 10 pt. Реферати другою мовою також повинен мати обсяг не менше 1800 та не більше 2000 фонетичних символів. На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів, які розділяються між собою крапкою з комою (10 pt – перший реферат, 9 pt – другий та третій реферати). З початку рядка великими літерами, шрифт напівжирний, пишеться заголовок з двокрапкою “**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**”. Тексти рефератів і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку). Реферати розділяються одним пустим рядком.

Основний текст статті наводиться після пропуску одного рядка шрифтом Times New Roman (Cyr), 12 pt. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ, ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються, літери великі, напівжирні, вирівнювання по центру. При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої літери і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру. Розділи або підрозділи розділяються одним пустим рядком. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться. У кінці тексту статті після пропуску одного рядка у розділі **ПОДЯКА** зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту. Потім розміщується розділ **КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ**, у якому автори декларують наявність фінансових або інших конфліктів інтересів, які могли вплинути на результати, інтерпретацію та висновки дослідження. Якщо немає конфлікту інтересів, так і потрібно заявити: «Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів». Потім розміщується розділ **Authors' ORCID ID**, у якому автори вказують адреси своїх профілів ORCID.

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи, підручники та навчальні посібники. Список літератури (шрифт 10 pt.) розміщується за основним текстом статті, виділяється як розділ **REFERENCES** і оформлюється згідно з міжнародним стилем оформлення списку наукових публікацій **Vancouver**. Приклади оформлення бібліографічних посилань можна подивитись на сайті журналу у розділі «Керівництво для авторів»: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

**Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться!**

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Electronic files of the contributions (created in MS Word 2007 and later versions) written in English or Ukrainian, scans of the expert inference directive and directive from the author's institution should be sent to the Editorial Office online via the website <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>.

A manuscript should be typed in single spacing on A4 paper. Use the MS Word with following options: 12 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, the upper margin should be 3.5 cm, and bottom one should be 2 cm. Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means (MathType or Microsoft Equation). Figures should be computer-generated in software packages intended for processing and visualization of scientific data: Origin, Mathcad, etc. The use of the MS Office Excel is not permitted. Use computer printed symbols for axes labeling. Insert prepared images into an MS Word file as files in \*.jpg, \*.jpeg, \*.png format within the area of the page specified above. Images must have a resolution of at least 300 dpi. We recommend the following layout: images are placed in the first row of the table with transparent outer borders, legends and comments to figures are placed in the second row of the table. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1), Table 1, Fig 1. If the article is written in Ukrainian, captions to figures and tables are duplicated in English.

Insert UDC in the first line on the left of a first page (11 pt, Italic). Leave one line blank. Place the title of the paper in capital letters (12 pt, bold, centered) on the next line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type the authors' affiliation and postal addresses of the institution where the actual work was done, including an e-mail address of the corresponding author (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission: day — in numbers, month — in words, year — in numbers (straight font, 10 pt, centered). Then, place the date of the paper submission (to be filled by editor).

After one blank line place two abstracts of the paper (written in Ukrainian and English). The first abstract should be written in the language of the manuscript. On the next line provide the second abstract (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered). Above the second abstract place the titles of the paper in the second language (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered), then — initials and surnames of the authors (straight font, 10 pt, bold, centered), and finally — the authors' affiliation names and addresses (9 pt, Italic, centered), every time starting from a new line. The abstract should be structured and consist of the following parts with headings: **Background, Objectives, Materials and Methods, Results, Conclusions**, each placed on a new line. The words "Резюме" and "Abstract" should be omitted. The headers of structural parts are written in bold letters, putting a dot after the header. The two abstracts of the paper should contain not less than 1,800 and not more than 2,000 phonetic symbols (i.e., without taking into account the spacing between words); straight font, 10 pt. On the next line type 5-8 key words, separated by a semicolon (10 pt — first abstract, 9 pt — second and third abstracts). Next, the header "**KEY WORDS:**" should be typed in bold capital letters at the beginning of the line. The texts of the abstracts and key words should be indented 0.5 cm from the left and right margins. The abstracts should be separated by a blank line.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper with following options: Times New Roman font, 12 pt, text justified. The first line of each paragraph should be indented 0.75 cm from the left margin. Each manuscript should contain the following elements: an introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS**. For theoretical less specified text organization is envisaged, e.g., instead of section **MATERIALS AND METHODS**, the sections **PROBLEM FORMULATION** or **MODEL** are recommended, etc. The sections are not numbered, capital letters, bold, centered. Sections may be subdivided into subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after each section or subsection. A dot should be omitted after headings of sections and subsections. Names of the foundations and grant numbers should be included in the section **ACKNOWLEDGMENTS** at the end of the text after one blank line. The next section should be **CONFLICT OF INTEREST** in which you should declare financial or any other conflict of interest. If there is no conflict of interest, you can state: "The authors declare that there is no conflict of interest." The next section should be **Authors' ORCID ID** in which you should include ORCID internet addresses of all authors.

References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers, textbooks and tutorials are prohibited. List of references (10 pt) should be given at the end of the manuscript as a separate section **REFERENCES**, formatted according to the **Vancouver** style for scientific publications.

The examples for reference formats are given on the journal's website in the "Author Guidelines": <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

**Manuscripts that do not meet the requirement mentioned above will not be considered for publication!**

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 50

Збірник наукових праць

Укр. та англ. мовами.

Комп’ютерне верстання к.ф.-м.н. Горобченко О. О.

Підписано до друку 09.01.2024. Формат 60×84 1/8.  
Папір офсетний. Друк ризографічний.  
Ум. друк. арк. 3,96. Обл.-вид. арк. 4,61. Наклад 50 пр.

61022, Харків, майдан Свободи, 4  
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

---

Надруковано: Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна  
61022, Харків, майдан Свободи, 4, тел. +38-057-705-24-32  
Свідоцтво суб’єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09