

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ ԵՎ ՍՊՈՐՏԻ
ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՂԱՄԱՐՅԱՆ ՎԻԿՏՈՐ ՍԱՄՎԵԼԻ

ԵՐԿՏԵՂԱԿԱԼՎԱԾ ՊԻՊԵՐԱԶԻՆՆԵՐԻ և ԴՐԱՆՑ ԱԾԱՆՑՅԱԼՆԵՐԻ
ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱԼՑՀԵՅՄԵՐԻ
ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ՊԱԹՈԳԵՆԵԶՈՒՄ ՆԵՐԳՐԱՎՎԱԾ ՈՐՈՇ ԹԻՐԱԽՆԵՐԻ ՀԵՏ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ 2026

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА РА
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАМАРЯН ВИКТОР САМВЕЛОВИЧ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИЗАМЕЩЕННЫХ ПИПЕРАЗИНОВ И
ИХ ПРОИЗВОДНЫХ С НЕКОТОРЫМИ МИШЕНЯМИ, ВОВЛЕЧЕННЫМИ В
ПРОЦЕСС ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.02 – Биофизика, биоинформатика

ЕРЕВАН 2026

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում
Գիտական ղեկավար՝

Կենս. գիտ. թեկնածու
Հունանյան Լեոնիկ Սուրիկի

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Ֆիզմաթ. գիտ. դոկտոր
Պողոսյան Արմեն Համլետի
Կենս. գիտ. թեկնածու

Առաջատար կազմակերպություն՝

Առաքելով Գրիգոր Գալուստի
ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվ.
Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտը

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2026թ. սեպտեմբերի 4-ին
ժամը 15:00-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲԿԳԿ-ի
Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք
Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի
գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2026թ. օգոստոսի 4-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական
քարտուղար, Կենս. գիտ. դոկտոր, դոցենտ

 Մ.Ա. Փարսադանյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете

Научный руководитель:

кандидат биол. наук

Унания Лерник Сурикович

Официальные оппоненты:

доктор физ.-мат. наук,

Погосян Армен Гамлетович

кандидат биол. наук

Аракелов Григор Галустович

Ведущая организация:

Институт Физиологии им. Л.А.Орбели НАН
РА

Защита диссертации состоится 4-го сентября 2026г. в 15:00 часов на заседании
Специализированного совета 051 по Биофизике КВОН РА при Ереванском
государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, факультет
биологии).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного
университета.

Автореферат диссертации разослан 4-го августа 2026 г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,
доктор биол. наук, доцент

 М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Нейродегенеративные заболевания человека входят в пятерку медико-биологических направлений интенсивно изучаемых в современном научном сообществе. На основе последних данных академического консорциума по разработке лекарств (ADDC) 65,61% научных учреждений ведут поиск новых биоактивных соединений для профилактики и лечения нейродегенеративных заболеваний, а в частности, для Болезни Альцгеймера (БА). Это обусловлено тем, что в настоящее время в мире более 55 млн. человек болеют этим недугом. По прогнозам Всемирной Ассоциации БА к 2050 году число больных с диагнозом БА достигнет свыше 139 млн. человек. С 2000 по 2022 год число смертей от БА удвоилось, в то время как смертность от сердечных заболеваний снизилась. Социально-экономические последствия БА огромны. Несмотря на десятилетия исследований существующие методы лечения лишь временно облегчают симптомы и не воспрепятствуют разрушению нервных клеток. Одобренные препараты, такие как ингибиторы холинэстеразы и антагонисты NMDA-рецепторов, временно улучшают когнитивные функции, но не предотвращают гибель клеток мозга. Кроме того, эти препараты часто имеют серьезные побочные эффекты, ограничивающие их применение. Растущая распространенность БА и ее человеческие и экономические издержки делают поиск эффективных методов лечения крайне необходимым. Хотя новые антиамилоидные антитела замедляют снижение когнитивных функций, их эффект скромен, и они сопряжены с риском серьезных побочных эффектов, таких как отек мозга, гепатотоксичность и др.

Сейчас в научном сообществе БА воспринимается как сложное, многофакторное заболевание, включающее множество патологических путей, таких как тау-патология, нейровоспаление, нейротрансмиттерная патология, окислительный стресс, нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах и генетические факторы. Это понимание требует перехода к созданию многоцелевой терапии и комбинированных подходов, которые одновременно будут воздействовать на несколько ключевых механизмов заболевания. В связи с этим, является чрезвычайно актуальным поиск новых низкомолекулярных агентов, воздействующих на патологические пути БА, проявляя многоцелевые свойства, охватывающие две и более метаболические пути регуляции. Поиск и создание соединений имеющий комбинированный терапевтический эффект, проявляющий минимальные побочные эффекты, синаптопротекторные свойства и возможность регуляции нервного сигнала на уровне нейротрансмиттеров, является критически важным при разработке стратегии лечения и профилактики БА.

Методы, используемые в компьютерном конструировании лекарств позволяют не только прогнозировать биотрансформацию химических соединений, в том числе виртуальных, а также прогнозировать молекулярные механизмы их взаимодействия с основными мишенями с учетом пространственной структуры.

Целью работы является: Исследование посвящено поиску биоактивных соединений на основе N,N-дизамещенных пиперазинов методами хемоинформатики и молекулярного моделирования. Оцениваются параметры их взаимодействия с мишенями TRPC3, TRPC6, TRPC7, AChE и BuChE для последующего создания фармакофорных моделей и разработки новых лекарственных агентов.

Осуществление поставленной цели достигалось решением следующих задач:

- Осуществление сфокусированного виртуального скрининга дизамещенных пиперазинов на основе химических библиотек ZINC и ChEMBL.
- Определение ADMET параметров и анализ соответствия «подобие лекарства» для исследуемой выборки.
- Хемогеномика на основе QSPR и QSAR алгоритмов для кандидатов в «соединение лидеры».
- Молекулярный докинг и конформационный анализ комплексов отобранных молекулярных моделей химических соединений с TRPC3, TRPC6, TRPC7, AChE и BUCH.
- Проведение молекулярного моделирования комплексов «соединений лидеров» с исследуемыми мишенями.
- Сравнительный анализ типов и механизмов действия «соединений лидеров» с исследуемыми мишенями.
- Построение фармакофорных признаков для «соединений лидеров» и генерация молекулярных моделей химических соединений с использованием методов хемоинформатики.

Научная новизна: Впервые был проведен направленный скрининг N,N-дизамещенных пиперазинов в качестве модуляторов для семейства TRPC каналов. Были отобраны топ-14 соединений, проявляющих высокие значения пространственно-энергетических параметров в комплексе со значениями QSAR и QSPR.

Для TRPC6 был определен периферийный сайт связывания и выявлен биофизические и стерические характеристики комплексообразований для отобранных соединений с использованием разных программ по биомоделированию.

Впервые была сконструирована полная трехмерная молекулярная модель тетрамера TRPC7 с использованием платформы AlphaFold3 включающие элементы искусственного интеллекта.

Определено соединение-лидер мульти-таргетного действия, с одной стороны проявляющий синаптопротекторные свойства с другой как холиномиметик.

Впервые на основе фармакофора соединения лидера были сгенерированы новые молекулярные модели химических соединений для дальнейших исследований.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Проведенный виртуальный скрининг на основе фармакофора N,N-дизамещенных пиперазинов выявил топ 14 кандидатов в «соединение лидеры» для TRPC 6. Отобранные топ 5 соединений показывают высокие значения критериев «подобия лекарства».
2. Соединение 2 взаимодействует с центральным сайтом связывания TRPC 6 проявляет селективное связывание и является положительным модулятором как гиперфорин, что было подтверждено *in silico* и *in vitro*.
3. Для комплексов AChE и BuChE показана, что среди пяти кандидатов могут быть как селективные ингибиторы (соединение 4 селективен для BuChE, соединение 2 для AChE), так и бифункциональные ингибиторы (соединение 5, соединение 3) проявляющие мультитаргетные свойства
4. Построены фармакофорные модели для сфокусированного и диверсифицированного виртуального скрининга с учетом лидирующих топ 5 соединений.

Практическое значение работы: Одним из подходов современной фармацевтики является создание и тестирование новых лекарственных соединений используя информационные технологии, которые ускоряют процесс поиска и верификации биоактивных соединений с учетом биодоступности.

Использованная методология виртуального скрининга, QSAR и QSPR, а также разных методик молекулярного моделирования и обработки больших данных с элементами искусственного интеллекта, позволят исследовать взаимодействие новых биоактивных соединений с синаптопротекторными свойствами для TRPC каналов, а также предложить химикам-синтетикам новые классы комбинированных субстанций для синтеза и дальнейшего изучения.

Кроме того, экспериментально верифицированные *in silico* данные, полученные в результате исследования, могут стать тестовой выборкой для разработки модели, прогнозирующей синаптопротекторные свойства для разных классов соединений.

Вместе с этим выявленный нами соединений лидер, который был синтезирован и прошел *in vitro*, *in vivo* исследования, может быть рекомендован фармацевтическим компаниям как потенциальное лекарственное соединение бинарного действия. О чем свидетельствует поданный совместный патент на изобретение «Применение производного пиперазина для лечения деменции альцгеймерского типа, связанных с нарушениями кальциевой регуляции»

Разработанные подходы могут быть рекомендованы научным учреждениям и лабораториям, занимающимся вопросами медико-биологических проблем и медицинской биофизики, а также исследовательским центрам работающих в области патологии БА.

Результаты диссертационной работы могут использоваться в качестве спецкурса, при выполнении курсовых, дипломных и диссертационных работ по специальности биоинформатика, хемоинформатика, молекулярная фармакология, медицинская химия и биофизика.

Апробация работы: Основные положения и результаты диссертационной работы были доложены, обсуждены и получили одобрение на следующих международных конференциях и научных симпозиумах: XXVII и XXX Симпозиумах по биоинформатике и компьютерному поиску лекарств (Москва, Россия, 2021г. и онлайн, 2021г.). На Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2021» (Москва, Россия, онлайн, 2021г.), На XI Международной учебно-методической конференции «Инновации в образовании» (Ереван, Армения, 2021г.), Материалы диссертации также неоднократно представлялись на научных семинарах на кафедре Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии Российско-Армянского Университета.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 7 работ.

Объем и структура работы: Диссертационная работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы, насчитывающего 116 наименований. Диссертация изложена на 116 страницах, включает 10 рисунков и 16 таблиц, и 6 графиков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении кратко описывается структура диссертационной работы, обсуждаются ее цель, актуальность, научная новизна и практическое значение поиска

новых терапевтических мультитаргетных агентов для лечения болезни Альцгеймера (БА).

Первая глава посвящена обсуждению имеющихся в научной литературе данных о современных подходах к компьютерному дизайну лекарств (CADD), патогенезе БА, включая детальный разбор амилоидной, холинергической и кальциевой гипотез. Приводятся данные о структурно-функциональных особенностях каналов транзиторного рецепторного потенциала (TRPC3, TRPC6, TRPC7) и холинэстераз (AChE, BuChE) при нейродегенерации. Обсуждается роль и перспективы использования пиперазинов в качестве нейропротекторных агентов и модуляторов при БА.

Вторая глава посвящена материалам и методам *in silico* исследования.

Использованные материалы (Объекты исследования и базы данных). В компьютерных экспериментах в качестве молекулярных мишеней были использованы следующие валидированные 3D-модели из базы данных RCSB PDB: гомотетрамер TRPC6 человека (PDB ID: 5YX9), гомотетрамер TRPC3 (PDB ID: 7DXB), димер ацетилхолинэстеразы (PDB ID: 4PQE) и бутирилхолинэстераза (PDB ID: 7Q1M). Полноразмерная молекулярная модель тетрамера TRPC7 была сконструирована *de novo*. В качестве химического пространства для виртуального скрининга применялись базы данных ZINC15 и ChEMBL_33, откуда отбирались модели соединений, соответствующие фармакофорному мотиву дизамещённых пиперазинов. В качестве контрольных соединений (известных модуляторов) использовались гиперфорин (CID: 441298) для каналов TRPC и донепезил (CID: 3152) для холинэстераз, полученные из базы PubChem.

Использованные программные комплексы и вычислительные ресурсы. Первичная подготовка одномерных (SMILES) и трехмерных структур лигандов, а также оптимизация их геометрии (дескриптор MM2) проводились с использованием OpenBabel 2.4.1, RDKit 2021.3.1 и пакета ChemOffice 20.1. Унификация протонного состояния активных остатков мишеней осуществлялась с помощью AutoDock Tools или Schrödinger Protein Preparation Wizard 11.2. Оценка подобия и ADMET-параметров выполнялась с использованием веб-сервисов SwissSimilarity, SwissADME, admetSAR и PeoTox.

Процедура молекулярного докинга реализовывалась в программе AutoDock Vina 1.2.0. Моделирование молекулярной динамики комплексов проводилось с использованием комплекса GROMACS (v.2020.4 - 2023) с применением силового поля CHARMM 36m для белков и CGenFF для лигандов. Симуляции протекали в ансамблях NVT и NPT в условиях, имитирующих физиологические (концентрация ионов Na⁺ Cl⁻ 0,15 М, температура 300 К с термостатом Берендсена, давление 1 атм) с шагом интегрирования 2 фс. Предсказание структуры TRPC7 выполнялось с помощью локальной установки алгоритма AlphaFold 2 (модуль AlphaFold-Multimer).

Сравнительный анализ, кластеризация и визуализация результатов (RMSD, флуктуации, водородные связи) проводились с применением программ BIOVIA Discovery Studio, VMD, XMGrace, Graphpad Prism 10, а также собственных алгоритмов на базе Python (алгоритм FOREL). Создание фармакофорных моделей осуществлялось через сервер PharmaGist.

Для выполнения ресурсоемких вычислений использовались мощности Армянского национального суперкомпьютерного центра им. Ш. Азнавура (Intel Xeon CPU E5-2698 v4), Суперкомпьютерного центра СПбПУ Петра Великого, а также локальные

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Виртуальный скрининг N, N-дизамещенных пиперазинов и определение ADMET параметров выборки: на первом этапе работы был реализован масштабный многоуровневый виртуальный скрининг химических соединений, направленный на поиск новых мультитаргетных агентов. Исходное химическое пространство поиска охватывало 15 млн ($1,5 \times 10^7$) виртуальных структур. С использованием фармакофорной модели N,N-дизамещенных пиперазинов, выбранной благодаря ее высокому потенциалу в нейрофармакологии, из данной базы была выделена первичная группа из 858 молекул. Эти структуры продемонстрировали индекс подобия целевому паттерну в диапазоне 0,68–1,0. Последующая процедура канонизации баз данных и строгого удаления структурных дубликатов позволила сузить выборку до 515 уникальных SMILES-записей.

Для минимизации рисков на последующих этапах *in vitro* и *in vivo* исследований был проведен комплексный анализ ADMET-параметров (всасывание, распределение, метаболизм, выведение и токсичность) с применением предиктивных моделей QSAR и QSPR. В результате строгим критериям «подобности лекарству» (drug-likeness) стала соответствовать 211 молекула. Итоговым фильтром на данном этапе послужил молекулярный докинг с мишенью TRPC6 в сочетании с алгоритмом статистической классификации LOESS. Это позволило оценить аффинность взаимодействия и идентифицировать 14 наиболее перспективных соединений-лидеров с высоким терапевтическим потенциалом (Рис.1.)

Детальный структурный анализ топ-14 кандидатов показал, что они формируют три обособленных химических кластера с максимальным индексом внутригруппового подобия $\sigma \leq 0,75$, что обеспечивает необходимое структурное разнообразие выборки. Установлено, что все соединения-лидеры оптимальны по физико-химическим свойствам: они обладают молекулярной массой менее 500 г/моль, выраженной липофильностью и содержат от 3 до 5 акцепторов водородных связей. Особое внимание в работе уделено прогнозированию биодоступности и токсикологической безопасности. Вычислительные *in silico* эксперименты подтвердили, что все 14 отобранных соединений способны проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), что является фундаментальным условием для таргетной терапии заболеваний центральной нервной системы.

Кроме того, показана их способность эффективно абсорбироваться в желудочно-кишечном тракте посредством пассивного транспорта, что предполагает удобство потенциального перорального приема. Оценка токсикологического профиля свидетельствует о высокой степени безопасности исследуемых кандидатов: ни для одной из 14 молекул не прогнозируется мутагенного, канцерогенного эффекта, гепатотоксичности или острой пероральной токсичности. Установлено, что соединения 1 и 3 полностью лишены раздражающего действия, в то время как остальные молекулы могут выступать лишь умеренными тканевыми раздражителями.

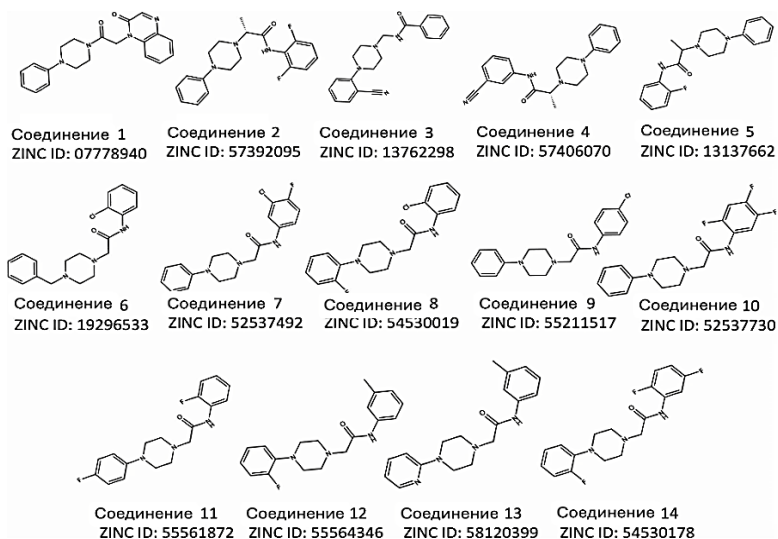


Рис.1. 2D структуры топ 14 соединений, отобранных в процессе виртуального скрининга имеющие свойства «соединения лидера».

Полученные результаты сформировали надежную базу для дальнейшего анализа конформационной динамики и мультитаргетных свойств отобранных лигандов.

Моделирование de novo и структурная валидация полноразмерного гомотетрамера TRPC7 человека: Канал TRPC7 остается наименее структурно изученным представителем подсемейства TRPC. В отличие от гомологов TRPC3 и TRPC6, для которых в базе данных Protein Data Bank (PDB) представлены криоэлектронные и рентгеноструктурные модели высокого разрешения, полная экспериментально полученная пространственная модель тетрамера TRPC7 в доступных базах данных на сегодняшний день отсутствует. Данный факт подтверждается ресурсом UniProt. Согласно записи с идентификационным номером UniProtKB: Q9HCX4 (относится к человеческому белку TRPC7, состоящему из 862 аминокислотных остатков), в разделе структурной аннотации отсутствуют полноразмерные конформации, полученные эмпирическим путем.

В результате использования сервера AlphaFold 3. нами была предсказана тетрамерная модель TRPC7. Днная модель TRPC7 демонстрировала типичную для TRPC каналов архитектуру гомотетрамера с шестью трансмембранными спиралями для каждой субъединицы и цитозольные концевые домены (coiled-coil на С-конце и IP3 рецепторами на N-конце). Были сгенерированы 5 гомологичных моделей имеющие разные степени достоверности.

Была выбрана модель у которого "ranking_score" равно 0.88. необходимо отметить, что значения "ranking_score" является совокупностью ptm, iptm, fraction_disordered и has_clash значений определяющие степени достоверности генерируемой модели и оценивается в диапазоне от -100 до 1,5. Полученная нами значения неупорядоченности тетрамерной структуры "fraction_disordered" равна 0.14 (диапазон 0–1), это означает, что все 4 цепи модели умеренно упорядочены относительно друг другу. Количества

столкновений цепей (has_clash) имеют нулевое значение. Рассчитанные параметры топологического сходства всех интерфейсов гомотетрамера равна "iptm": 0.81 (диапазон 0–1). Значение оценки топологического сходства полной структуры "ptm": 0.82 (диапазон 0–1) (см. рис. 2).

Эти метрики отражают точность предсказанной белковой структуры и расположение субструктур внутри структуры, что помогает идентифицировать критически важные области, такие как сайты связывания. Расчетное значение pLDDT в трансмембранных участках составило ~98, тогда как некоторые периферические петли имели пониженное качество в пределах pLDDT ~50–60 (N- и C-концов). Междоменные контакты пространственной структуры в пределах RMSD < 0,5 Å.

Принимая во внимание полученные стерические характеристики предсказанной модели, особенно в трансмембранных участках, где находится центральный сайт связывания имеет достоверность pLDDT ~ 98, можно констатировать, что данная модель вполне пригодна для дальнейших исследований.

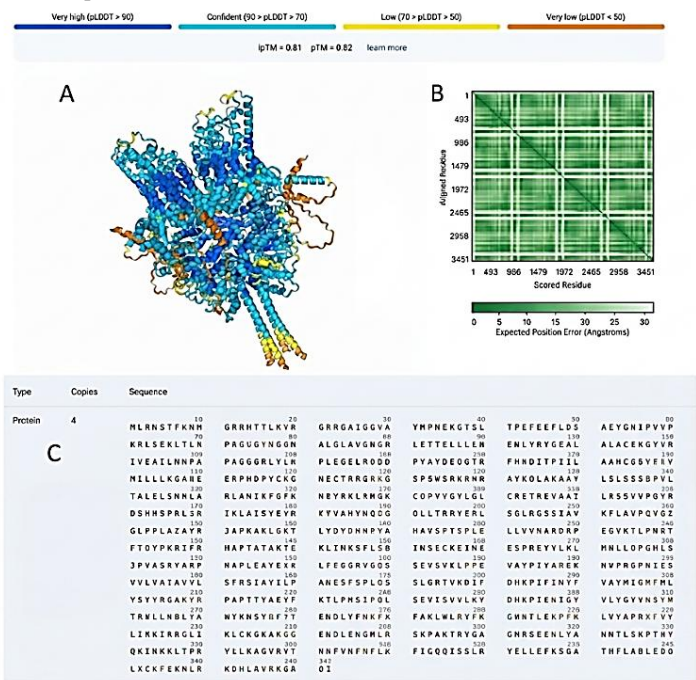


Рис 2. Визуализация полученной тетрамерной структуры TRPC7. А. Трехмерная структура TRPC7 с высокими значениями достоверности модели. В. Матрица выравнивания и оценки положений субструктур. С. Аминокислотная последовательность предсказанной модели.

Молекулярный докинг и конформационный анализ топ 14 соединений лидернов с TRPC6: общеизвестно, что клеточный ответ TRPC6 опосредуется аминокислотными остатками, входящими в центральный сайт связывания. В отличие от этого, многие

классы соединений, помимо основного сайта связывания, проявляют сродство к другим участкам мишени.

Использование данного подхода было стратегическим выбором, который непосредственно привел к выявлению периферийного сайта связывания на TRPC6 для N-N дизамещенных пиперазинов который потенциально может иметь модулирующее действие.

На основе полученных нами результатов молекулярного докинга и кластерного анализа для топ-14 соединений с TRPC6 выявлены два места связывания. Распределение лигандов в местах связывания можно разделить на три основные группы.

В первую группу вошли соединения взаимодействующие с центром связывания (1–5). Вторая группа сформирована из соединений связывающегося с периферийным участком TRPC6 (6–10). Соединения проявляющие взаимодействие как с центром связывания, так и с периферийным участком входящие в третью группу (11–14).

У первой группы (1–5), в центре связывания, взаимодействие осуществляется в основном за счет гидрофобных и электростатических сил. Соединения 11–14 по типу действия показывают аналогичную картину для 1–5. При этом соединения 2-4 и 14 полностью повторяют стерические характеристики контрольного соединения при взаимодействии с центром связывания TRPC6. (Рис. 3.).

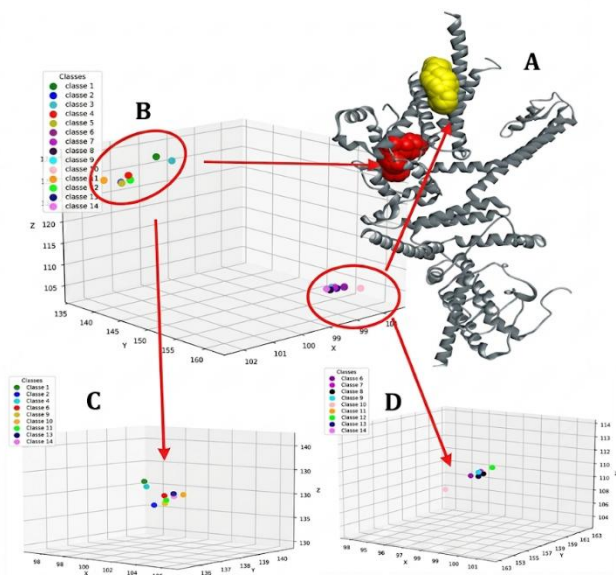


Рис. 3. Визуализация кластеризации пространственно-энергетических характеристик топ 14 кандидатов «соединений лидеров» взаимодействующие TRPC6. А. расположение лигандов на сайтах связывания TRPC6. В. Полученные кластеры, С. Визуализация субкластера в центре связывания и D. на периферийном сайте связывания, соответственно (метрика визуализации приведена в Å-х).

Молекулярный докинг и конформационный анализ AChE и BuChE в комплексе с топ 5 соединениями лидерами: Сужение выборки с 14 до 5 наиболее перспективных кандидатов для дальнейшего анализа и валидации моделей базировалось на детальном анализе механизмов их связывания с TRPC6. Отобранная пятерка продемонстрировала строгое и высокоаффинное связывание в центральном сайте TRPC6. (Таблица 1.)

Результаты молекулярного докинга с AChE и BuChE показали, что соединение 4 не взаимодействует с AChE, но демонстрирует высокое сродство к BuChE. В отличие от этого, соединение 2 показало хорошие значения сродства к AChE. Результаты показывают, что соединение 2 взаимодействует с периферическим анионным участком (PAS) AChE, блокируя вход в каталитическую щель, что интерпретируется как вероятный ингибитор. (Таблица 1).

Таблица 1. Рассчитанные биофизические параметры взаимодействия для 5 соединений лидеров с AChE и BuChE.

Соединения	AChE		
	Энергия (kcal/mol)	Константа Связывания M ⁻¹	RMSD
DPS	-7.44±0.37	2.64X10 ⁵	1.256
1	-7.69±0.38	4.01X10 ⁵	1.387
2	-8.08±0.40	7.77X10 ⁵	1.108
3	-7.20±0.36	1.78X10 ⁵	1.495
4	-	-	-
5	-7.23±0.36	1.87X10 ⁵	1.156
BuChE			
DPS	-9.28±0.46	5.68X10 ⁶	1.256
1	-9.43±0.47	7.47X10 ⁶	1.387
2	-9.32±0.47	6.21X10 ⁶	1.108
3	-8.94±0.45	3.30X10 ⁶	1.495
4	-9.53±0.48	8.80X10 ⁶	1.268
5	-9.10±0.45	4.30X10 ⁶	1.156

Соединение 5, соединение 1 и соединение 3 показали различную степень сродства к обоим мишеням. Соединение 5 демонстрирует профиль, схожий с донепезилом при связывании с AChE. Соединение 1 показал умеренное связывание с обоими ферментами без выраженной селективности.

В отличие от этого, соединение 3 показал относительно высокое сродство как к AChE, так и к BuChE. Таким образом, полученные нами результаты молекулярного докинга показали, что среди пяти кандидатов могут быть как селективные ингибиторы (например, соединение 4 селективен для BuChE, соединение 2 для AChE), так и бифункциональные ингибиторы (соединение 5, соединение 3).

Молекулярный докинг TRPC7 в комплексе с топ 5 соединениями лидерами: для оценки моделирующего действия соединений-лидеров был проведен молекулярный докинг с использованием гомологичной модели белка TRPC7. На основе полученных энергетических характеристик комплексообразования соединение 2 явно выделяется как наиболее перспективный кандидат. Оно демонстрирует наилучшее значение энергии связывания (-8.41 ± 0.42 ккал/моль) и одну из самых высоких констант связывания (1.35×10^6 M⁻¹).

Соединения 1, 3, 4 и 5 также показывают положительные результаты, образуя группу вторичных лидеров. Наши результаты показывают, что соединение 2 идентифицировано как ведущий кандидат, обладающий не только высоким предсказанным сродством, но и исключительной конформационной стабильностью в сайте связывания. (Таблица 2.)

Таблица 2. Биофизические показатели комплексов для топ-5 соединений-лидеров и референсного лиганда с центральным сайтом связывания TRPC7

Соединение	Центральный сайт связывание		
	Энергия (ккал/моль)	Константа связывания М ⁻¹	RMSD l.b.
1	-8.96±0.35	3,42 x10 ⁵	1.638
2	-8.41±0.42	1,35 x10 ⁶	0.242
3	-7.90±0.39	5,75 x10 ⁵	1.377
4	-7.52±0.38	3.05 x10 ⁵	1.591
5	-7.74±0.39	4.34 x10 ⁵	1.739
НУР	-7.09±0.35	1.49 x10 ⁵	1.539

В результате проведенного нами рационального виртуального скрининга позволило отобрать ряд пиперазинов и их производных и выделить соединение 2 в качестве основного кандидата для дальнейших исследований.

Молекулярная динамика Топ-5 соединений с TRPC6 мономерной формы: для оценки стабильности комплексов TRPC6 с соединениями 1–5, отобранными по результатам молекулярного докинга, был использован метод молекулярной динамики. Проведенное моделирование позволило оценить пространственную стабильность комплексов, энергетические характеристики взаимодействия и образование водородных связей. В течение первых 5 нс все исследуемые соединения сохраняли стабильное взаимодействие с TRPC6, а значения RMSD не превышали 0,75 нм. Для соединения 3 наблюдался устойчивый сдвиг около 1,2 нм, тогда как соединение 1 после 12 нс демонстрировало выраженную нестабильность с изменением траектории до 4 нм. Для соединения 4 увеличение RMSD достигало 1,95 нм после 13 нс. Контрольное соединение гиперфорин сохраняло стабильность до 13,4 нс, после чего наблюдался стерический сдвиг со значением RMSD около 1,85 нм. Наиболее стабильным оказался комплекс с соединением 2, для которого RMSD на протяжении всей симуляции не превышал 0,5 нм (График 1А). Расчет энергетических характеристик показал, что значения кулоновских взаимодействий для большинства соединений не превышали $-3,43 \pm 0,17$ ккал/моль. Исключение составило соединение 1 ($-32,99 \pm 1,65$ ккал/моль), что, вероятно, связано с нестабильностью его траектории. Анализ ван-дер-ваальсовых взаимодействий подтвердил их ведущую роль в стабилизации комплексов соединений с центральным сайтом связывания TRPC6 (Таблица 3). Полученные данные свидетельствуют, что основным фактором стабилизации комплексов являются ван-дер-ваальсовы взаимодействия. При этом соединение 2 характеризовалось наиболее благоприятным сочетанием пространственной стабильности и энергетических параметров, тогда как соединение 1 отличалось выраженной нестабильностью комплекса. Остальные соединения демонстрировали промежуточные показатели стабильности. Таким образом, результаты молекулярной динамики согласуются с данными молекулярного докинга и подтверждают выбор соединений 1–5 в качестве соединений-лидеров. Наиболее стабильным оказался комплекс TRPC6 с соединением 2, что послужило основанием для его дальнейшего исследования как перспективного положительного модулятора TRPC6.

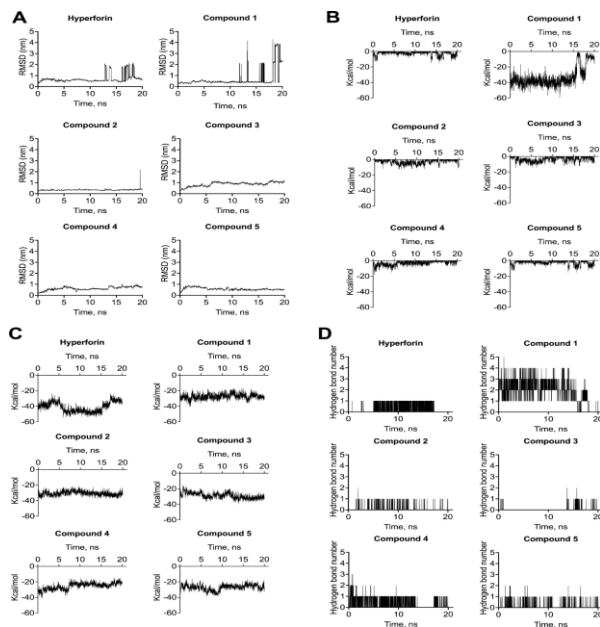


График 1. Биофизические показатели комплексообразований соединений 1-5 с мономерной формой TRPC6 полученные на основе молекулярной динамики. А) значения среднеквадратичного отклонения (RMSD), В) энергии кулоновских сил, С) энергии ван-дер-ваальсовых взаимодействий, D) количества водородных связей.

Таблица 3: Энергетические показатели комплексов мономерной формы TRPC6 с топ 5 соединениями

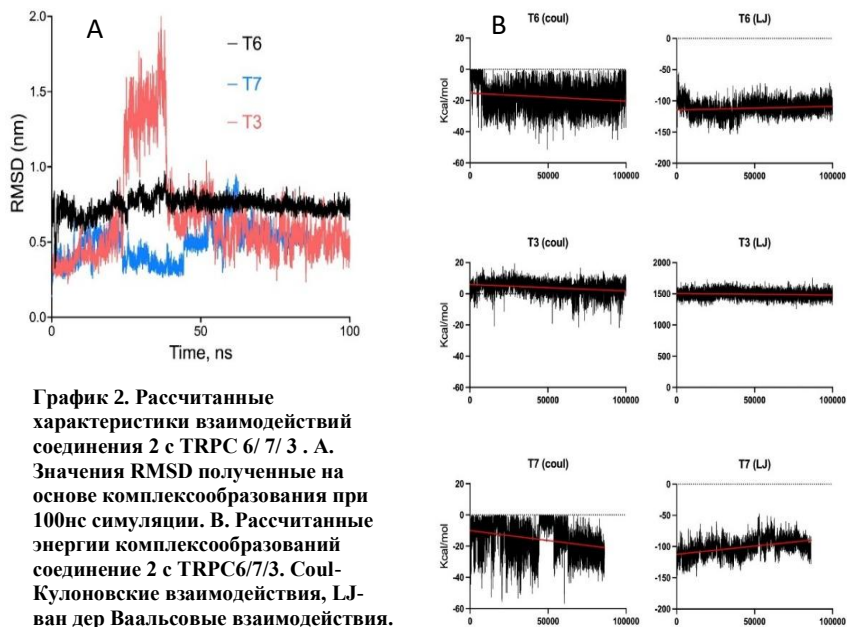
Соединение	Кулоновские силы Coul-SR (ккал/ моль)	Ван дер ваальсовые силы LJ-SR (ккал/ моль)
1	-32.99 ± 1.65	-27.40 ± 1.37
2	-2.86 ± 0.14	-30.80 ± 1.54
3	-1.97 ± 0.10	-27.18 ± 1.36
4	-2.77 ± 0.14	-25.47 ± 1.27
5	-3.37 ± 0.17	-28.85 ± 1.44
HYP	-3.43 ± 0.17	-41.05 ± 2.05

Молекулярная динамика TRPC3, TRPC6 и TRPC7 тетрамерной формы с соединением 2: для оценки специфичности взаимодействия соединения 2 были проведены молекулярно-динамические исследования его комплексов с тетрамерными формами каналов TRPC3, TRPC6 и TRPC7. Использование полноразмерных тетрамерных структур позволило исследовать стабильность комплексов в условиях, наиболее приближенных к физиологическим. Выбор соединения 2 был обусловлен результатами молекулярного докинга, молекулярной динамики мономерной формы TRPC6 и предварительными экспериментальными исследованиями, подтвердившими его положительную модуляцию TRPC6. Анализ RMSD показал различную стабильность комплексов. Для комплекса соединения 2 с TRPC3 наблюдались выраженные изменения траектории в интервале 35–37 нс (RMSD около $1,97 \pm 0,09$ Å),

после чего отмечалась кратковременная стабилизация ($0,862 \pm 0,04 \text{ \AA}$). Однако на протяжении остального времени моделирования сохранялись скачкообразные флуктуации, свидетельствующие об отсутствии устойчивой фиксации лиганда.

Комплекс соединения 2 с TRPC7 также характеризовался меньшей стабильностью. Значения RMSD изменялись в диапазоне $0,584\text{--}1,28 \text{ \AA}$, а на 58-й и 62-й наносекундах наблюдались дополнительные смещения траектории. Полученные результаты свидетельствуют о менее надежном удержании лиганда в центральном сайте связывания TRPC7.

Наиболее стабильным оказался комплекс соединения 2 с TRPC6. На протяжении всего моделирования существенных изменений положения лиганда не наблюдалось, а среднее значение RMSD составляло $0,741 \pm 0,03 \text{ \AA}$. Анализ вариации RMSD также подтвердил преимущество комплекса с TRPC6: значение вариации составило $0,077$ против $0,497$ для TRPC3 и $0,239$ для TRPC7, что свидетельствует о значительно более высокой пространственной стабильности комплекса. Энергетические характеристики согласуются с пространственным анализом. Для комплекса соединения 2–TRPC6 значения кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий составили $-4,2 \pm 0,21$ и $-26,75 \pm 1,34$ ккал/моль соответственно. (График 2). Для комплекса с TRPC7 эти



показатели были менее выражены ($-1,91 \pm 0,10$ и $-24,7 \pm 1,24$ ккал/моль), тогда как для TRPC3 получены положительные значения кулоновских и ван-дер-ваальсовых взаимодействий ($0,95 \pm 0,05$ и $356,84 \pm 17,84$ ккал/моль), указывающие на отсутствие эффективного связывания,

Дополнительный анализ показал образование соединением 2 водородной связи с остатком ASN617 центрального сайта связывания TRPC6 с вероятностью до 6,54%, что способствует дополнительной стабилизации комплекса.

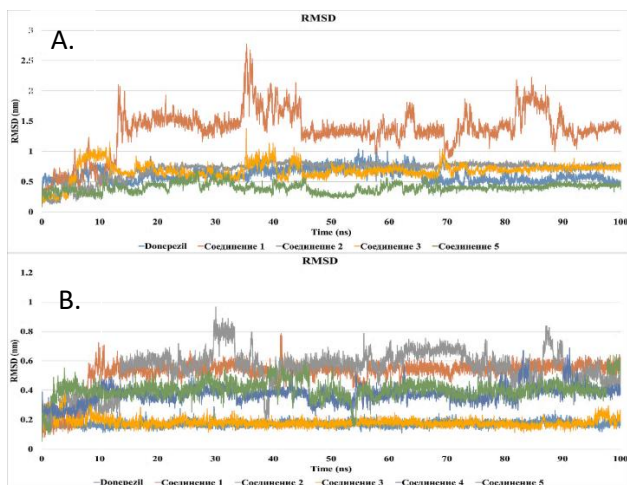
Таким образом, результаты молекулярно-динамического моделирования подтверждают, что соединение 2 обладает наиболее высокой стабильностью и средством именно к TRPC6.

Комплекс характеризуется минимальными значениями RMSD, благоприятными энергетическими параметрами и сохранением ключевых взаимодействий, тогда как комплексы с TRPC3 и TRPC7 значительно менее стабильны. Полученные данные подтверждают результаты исследований мономерной модели TRPC6 и позволяют рассматривать соединение 2 как наиболее перспективный положительный модулятор TRPC6.

Молекулярная динамика Топ-5 соединений с AChE и BuChE: В современной концепции болезни Альцгеймера важную роль в патогенезе играет нарушение холинергической передачи, а ацетилхолинэстераза (AChE) и бутирилхолинэстераза (BuChE) являются основными терапевтическими мишенями. В связи с развитием мультитаргетного подхода исследуемые производные пиперазина были рассмотрены как потенциальные соединения, способные одновременно воздействовать на несколько молекулярных мишеней. Для оценки их взаимодействия с AChE и BuChE проведено молекулярно-динамическое моделирование, в качестве контроля использовали донепезил. Результаты показали различный профиль взаимодействия исследуемых соединений с ферментами. Соединение 4 образовывало стабильный комплекс с BuChE (RMSD около 1,2 Å), тогда как в комплексе с AChE быстро покидало активный центр (RMSD >5 Å). Стабильность комплекса с BuChE обеспечивалась водородными связями с Gly116 и Gly117 и гидрофобным взаимодействием с Trp82 (Графики 3), что свидетельствует о возможной селективности данного соединения к BuChE.

Соединение 2 при взаимодействии с AChE сохраняло относительную стабильность в течение первых 20 нс, после чего стабилизировалось за счет взаимодействия с Tyr337. Связывание с периферическим анионным участком (PAS) сопровождалось уменьшением диаметра входного канала фермента примерно на 15%, что указывает на способность частично блокировать доступ к каталитическому центру и потенциально снижать амилоидогенез. Соединение 5 продемонстрировало профиль связывания, сходный с донепезилом. Стабильность комплекса с AChE обеспечивалась π - π -стекингом с Trp286, водородными связями с Tyr72 и дополнительным взаимодействием с Ser203 каталитической триады. В комплексе с BuChE соединение сохранялось около 70% времени, взаимодействуя с Trp82 и гидрофобными остатками, что позволяет рассматривать его как преимущественный ингибитор AChE с умеренной активностью в отношении BuChE. Соединение 1 оказалось наиболее стабильным в комплексе с BuChE (RMSD 0,8–1,0 Å) благодаря взаимодействиям с Glu197 и Trp82, тогда как из активного центра AChE полностью выходило уже к 20-й наносекунде моделирования, что свидетельствует о его потенциальной селективности к BuChE.

Комплексы соединения 3 с AChE и BuChE характеризовались высокой стабильностью (RMSD 1–1,5 Å). Лиганд взаимодействовал с Trp86 в AChE и Trp82, Val288 и Leu286 в BuChE, практически полностью заполняя каталитическую полость, что позволяет рассматривать соединение 3 как перспективный сбалансированный бис-ингибитор.



Энергетический анализ (Таблица 4) подтвердил результаты пространственного моделирования. Основной вклад в стабилизацию комплексов вносили ван-дер-ваальсовы взаимодействия, тогда как кулоновские взаимодействия зависели от структуры лиганда и особенностей активного центра ферментов.

Таким образом, интегральный анализ молекулярного докинга и молекулярной динамики показал, что небольшие структурные различия производных пиперазина существенно влияют на их профиль взаимодействия с холинэстеразами. Соединения 3 и 5 проявили мультитаргетные свойства как потенциальные бис-ингибиторы AChE и BuChE, соединения 1 и 4 продемонстрировали признаки селективности к BuChE, а соединение 2 — способность взаимодействовать с периферическим анионным участком AChE, что может обеспечивать дополнительный антиамилоидогенный эффект. Полученные результаты подтверждают перспективность исследуемых производных пиперазина для дальнейших экспериментальных исследований в качестве потенциальных средств терапии болезни Альцгеймера.

Таблица 4: Энергетические параметры комплексов

Соединение	AChE		BuChE	
	Кулоновские силы Coul-SR (ккал/моль)	Ван дер ваальсовы силы LJ-SR (ккал/моль)	Кулоновские силы Coul-SR (ккал/моль)	Ван дер ваальсовы силы LJ-SR (ккал/моль)
DPS	-2.47 ± 0.12	-26.57 ± 1.33	-10.24 ± 0.51	-38.69 ± 1.93
1	-6.01 ± 0.30	-25.20 ± 1.26	-1.57 ± 0.08	-27.63 ± 1.38
2	-4.02 ± 0.20	-27.39 ± 1.37	-27.75 ± 1.39	-30.49 ± 1.52
3	-2.57 ± 0.13	-30.76 ± 1.54	-2.11 ± 0.11	-37.80 ± 1.89
4	-2.02 ± 0.10	-16.39 ± 0.82	-7.52 ± 0.38	-34.64 ± 1.73
5	-4.67 ± 0.23	-21.85 ± 1.09	-4.38 ± 0.22	-32.21 ± 1.61

Фармакофор на основе топ-5 соединений-лидеров: Построение фармакофорной модели на основе пяти соединений-лидеров было выполнено с целью определения общей биоактивной конформации исследуемых производных пиперазина при взаимодействии с целевой мишенью. Фармакофорное моделирование позволяет оптимизировать поиск биологически активных соединений, ограничивая химическое пространство наиболее перспективными структурами. Кроме того, данный подход используется для оптимизации соединений-лидеров с сохранением высокой аффинности к мишени и улучшением фармакокинетических свойств, а также для поиска новых структурных классов соединений (scaffold hopping).

С использованием программы PharmaGist на основе пяти соединений были построены две фармакофорные модели (рис. 4).

Каждая модель включала восемь фармакофорных признаков, а их качество оценивали по коэффициенту эффективности, отражающему степень совпадения конформационных признаков между исследуемыми соединениями. Небольшое количество совпадений свидетельствует о высокой специфичности модели, тогда как большое число совпадений указывает на более универсальный характер фармакофора.

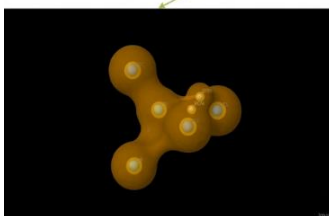
Первая модель характеризуется высокой селективностью и коэффициентом эффективности более 10. Она предназначена для сфокусированного виртуального скрининга, позволяющего отбирать соединения, максимально соответствующие заданной пространственной организации фармакофорных признаков. Вторая модель имеет коэффициент эффективности менее 9,0 и отличается более обобщенной структурой, что делает ее пригодной для диверсифицированного виртуального скрининга больших химических библиотек. Практическая ценность разработанных моделей была подтверждена при виртуальном скрининге базы данных ZINC. Для первой модели было найдено 44 соединения с высоким скором, тогда как вторая модель выявила 334 196 совпадений. Эти результаты отражают высокую специфичность первой модели и универсальность второй.

PharmaGist

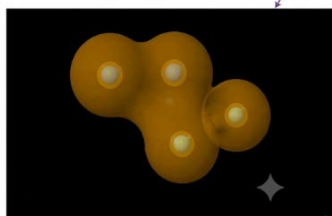
[About] [WebServer] [FAQ] [Help / Getting Started] Contact: podock@tau.ac.il

Best Pairwise Solution for Each Pair of Input Molecules:

Score	Jmol	Features	Spatial Features	Aromatic	Hydrophobic	Donors	Acceptors	Negatives	Positives	Molecules
10.853	Jmol	6	6	2	1	1	2	0	0	Str-5.mol2 Str-47.mol2
9.03368	Jmol	4	4	2	0	0	2	0	0	Str-5.mol2 Str-68.mol2
6.0118	Jmol	3	3	1	0	1	1	0	0	Str-5.mol2 Str-210.mol2
7.5209	Jmol	3	3	2	0	0	1	0	0	Str-5.mol2 Str-204.mol2



Фармакофор 1 – 44 совпадений



Фармакофор 2 – 334,196 совпадений

Рис 4. Полученные фармакофорные модели на основе топ5 соединений лидеров.

Разработанные фармакофорные модели представляют интерес для дальнейшего поиска и оптимизации новых производных пиперазина. Они могут использоваться при

виртуальном скрининге, выборе перспективных соединений для синтеза и изучении мультитаргетных агентов для терапии нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера. Таким образом, полученные фармакофоры дополняют результаты виртуального скрининга, молекулярного докинга и молекулярной динамики и могут служить эффективным инструментом дальнейшего компьютерного поиска новых биологически активных соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа направлена на всестороннюю оценку производных N,N-дизамещенных пиперазинов, рассматриваемых в качестве перспективных мультитаргетных соединений для терапии болезни Альцгеймера. С применением методов структурной биоинформатики, включая виртуальный скрининг, молекулярный докинг и анализ молекулярной динамики, были глубоко изучены молекулярные механизмы взаимодействия данных соединений с каналами TRPC (TRPC3, TRPC6, TRPC7) и холинэстеразами (AChE, BuChE). Исследования *in silico* убедительно продемонстрировали, что выявленное соединение-лидер (Соединение 2) является селективным и высокоаффинным модулятором центрального сайта TRPC6, механизм комплексообразования которого идентичен действию эталонного активатора — гиперфорина. Особую фундаментальную ценность работе придает впервые описанный аллостерический периферийный сайт связывания для TRPC6. Помимо направленного действия на кальциевые каналы, доказано, что исследуемые молекулы эффективно взаимодействуют с периферическим анионным участком холинэстераз, подтверждая свой мультитаргетный терапевтический профиль. Базируясь на этих данных, были сгенерированы оптимизированные фармакофорные модели для последующего рационального дизайна новых нейропротекторов. Важнейшим этапом работы стала успешная валидация теоретических данных в экспериментах *in vivo*, которые подтвердили способность Соединения 2 беспрепятственно преодолевать гематоэнцефалический барьер и оказывать целевое синаптопротекторное действие. Совокупность полученных трансляционных результатов послужила прочной основой для регистрации патента (№ 2025114462/04), закрепляющего применение данного производного пиперазина в качестве инновационного средства для лечения деменций альцгеймеровского типа.

ВЫВОДЫ

1. Проведен виртуальный скрининг N,N-дизамещенных пиперазинов как потенциальных модуляторов TRPC6. Из $1,5 \times 10^7$ соединений отобрано 515 структур, из которых 211 соответствовали критериям «подобия лекарства», а 14 были идентифицированы как перспективные соединения-лидеры.
2. Для TRPC6 кроме центрального сайта связывания описан периферийный сайт связывания для отобранных топ 14 соединений, что указывает на возможность аллостерической модуляции мишени.
3. Показана, что соединение 2, связывается с центральным сайтом связывания TRPC6 таким же образом, как гиперфорин. Соединение 2 селективно активирует TRPC6,

но не структурно схожие с ним TRPC3 и TRPC7, что было подтверждено *in silico* и *in vitro*.

4. Для комплексов AChE и BuChE показана, что среди пяти кандидатов могут быть как селективные ингибиторы (соединение 4 селективен для BuChE, соединение 2 для AChE), так и бифункциональные ингибиторы (соединение 5, соединение 3).
5. На основе 5 лидирующих соединений разработаны фармакофорные модели, пригодные для сфокусированного и диверсифицированного виртуального скрининга новых мультитаргетных соединений для терапии болезни Альцгеймера

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Zernov, N., Ghamaryan, V., Melenteva, D., Makichyan, A., Hunanyan, L., & Popugaeva, E. (2024). Discovery of a novel piperazine derivative, cmp2: a selective TRPC6 activator suitable for treatment of synaptic deficiency in Alzheimer's disease hippocampal neurons. *Scientific Reports*, 14(1), 23512. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-73849-z>
2. V.S. Ghamaryan, L.S. Hunanyan, Molecular Docking And Dynamic Simulations Of N-N-disubstituted Piperazines With ACHE and BuCHE, *Electr. J. Of Nat. Sci.*, 2(43), 2024, Pp.4-8, Doi: 10.55841/1728-791x-2024.2.43-4
3. Zernov, N., Melenteva, D., Ghamaryan, V., Makichyan, A., Hunanyan, L., & Popugaeva, E. (2025). NN-Substituted Piperazine, Cmp2, Improves Cognitive and Motor Functions in 5xFAD Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(10), 4591. <https://doi.org/10.3390/ijms26104591>
4. V.S. Ghamaryan Study Of The Peculiarities Of Interactions Of The Anticholinesterase Activity Of N-N-disubstituted Piperazines As Therapeutic Agents Against Alzheimer's Disease *Electr. J. Of Nat. Sci.*, 1(44), 2025 , Pp. 16-22, Doi:10.55841/1728-791X-2025.1.44-16
5. Мовсисян Ч.Г., Камарян В.С., Унанян Л.С., Овакимян А.С. Разработка программы конформационного анализа и визуализации результатов молекулярного докинга с использованием методов кластеризации *Вестник РАУ № 1*, стр.165-176, 2021. УДК 577.322; 004.852
6. Zernov n.I., Melentieva D.M., Ghamaryan V.S., Makichyan A.T., Hunanyan L.S., Popugaeva E.A. A positive allosteric modulator of TRPC6 promotes neuroprotective effects *in vitro* // *genes & cells*. - 2023. - Vol. 18. - N. 4. - P. 694-696. Doi: 10.17816/gc623415
7. Hunanyan, I.; Ghamaryan, V.; Makichyan, A.; Popugaeva, E. Computer-based drug design of positive modulators of store-operated calcium channels to prevent synaptic dysfunction in alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 13618. <https://doi.org/10.3390/ijms222413618>

ՂԱՄԱՐՅԱՆ ՎԻԿՏՈՐ ՍԱՄՎԵԼԻ

ԵՐԿՏԵՂԱԿԱԼՎԱԾ ՊԻՊԵՐԱԶԻՆՆԵՐԻ և ԴՐԱՆՑ ԱԾԱՆՅՅԱԼՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱԼՅՇԵՑՄԵՐԻ ՀԻՎԱՆԴՈՒԹՅԱՆ ՊԱԹՈԳԵՆԵԶՈՒՄ ՆԵՐԳՐԱՎՎԱԾ ՈՐՈՇ ԹԻՐԱՆՆԵՐԻ ՀԵՏ

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Հանգուցային բառեր. Ալցհեյմերի հիվանդություն, TRPC6, պիպերազինի ածանցյալներ, մոլեկուլային դոկինգ, մոլեկուլային դինամիկա, ֆարմակոֆորային մոդելավորում, AChE, BuChE, բազմաթիրախ դեղամիջոցներ, վիրտուալ սկրինինգ, CADD, նեյրոդեգեներատիվ հիվանդություններ:

Ատենախոսության նպատակն էր բացահայտել բազմաթիրախային (մոլտիտարգետային) ներուժով օժտված N,N-երկտեղակալված պիպերազինների նոր ածանցյալներ կիրառելով դեղամիջոցների համակարգչային նախագծման (CADD) ժամանակակից մոտեցումներ: Հաշվի առնելով Ալցհեյմերի հիվանդության (ԱՀ) պաթոգենեզի բարդ, բազմագործոն բնույթը, հատուկ ուշադրություն է դարձվել այն միացություններին, որոնք ունակ են հանդես գալ որպես TRPC6 խոնային անցուղու դրական մոդուլատորներ՝ կալցիումի հոմեոստազը վերականգնելու և սինապտոպրոտեկցիան խթանելու նպատակով՝ միաժամանակ ցուցաբերելով արգելակիչ (ինհիբիտորային) ակտիվություն ացետիլխոլինէսթերազի (AChE) և բուտիրիլխոլինէսթերազի (BuChE) նկատմամբ: Բազմաթիրախային լիգանդների (MTDL) այս ռազմավարությունը ներկայացնում է խիստ խոստումնալից մոտեցում ԱՀ-ի բուժման համար:

Իրականացվել է համապարփակ, բազմափուլ վիրտուալ սքրինինգի ռազմավարություն՝ հիմնված N,N-երկտեղակալված պիպերազինային ֆարմակոֆորի վրա՝ ընդգրկելով մոտ 1.5×10^7 վիրտուալ միացությունների հսկայական տարածություն: Այս նախնական գրադարանը ֆիլտրվել և կրճատվել է մինչև 515 եզակի կառուցվածքների, որոնք խստորեն գնահատվել են իրենց ֆիզիկաքիմիական, ֆարմակոկինետիկ և տոքսիկոլոգիական հատկությունների տեսանկյունից՝ ADMET վերլուծության միջոցով: Կիրառելով Լիպինսկու, Վեբերի և Գոսի «դեղանմանության» (drug-likeness) չափանիշները՝ աղետամոքսային տրակտում պահվել ներծծման, արյունառեղային պատենշի (ԱՌՊ) բարձր թափանցելիության և ընդհանուր անվտանգության պրոֆիլների (մուտագենության կամ հեպատոտոքսիկության բացակայություն) կանխատեսումների հետ մեկտեղ՝ ընտրությունը նեղացվել է մինչև 211 դեղանման մոլեկուլների, որոնցից առանձնացվել են 14 խիստ հեռանկարային առաջատար (լիդեր) միացություններ:

Այնուհետև իրականացվել են մոլեկուլային դոքինգի հետազոտություններ TRPC6, TRPC3, TRPC7, AChE և BuChE թիրախների նկատմամբ: Հատկանշական է, որ TRPC6-ի դոքինգի արդյունքները բացահայտեցին ոչ միայն փոխազդեցություններ դասական կենտրոնական կապող գրպանի ներսում, այլև նոր ծայրամասային (պերիֆերիկ) կապող կայքի առկայություն, ինչը վկայում է ալոստերիկ մոդուլացիայի հնարավորության մասին: Խստորեն ընտրված հինգ առաջատար միացությունները ցուցաբերեցին կայուն կոմպլեքսներ հատկապես TRPC6-ի կենտրոնական գրպանում՝ կատարելապես վերարտադրելով բնական էտալոնային ակտիվատորի՝ հիպերֆորինի կապման օրինաչափությունը՝ միաժամանակ դրսևորելով կապման խիստ բարենպաստ էներգիաներ: Ավելին, խաչաձև դոքինգը (cross-

docking) ցույց տվեց, որ այս լիգանդները նույնպես զգալի աֆինություն են ցուցաբերում երկու խոլինեսթերազների նկատմամբ՝ հաստատելով նրանց հզոր բազմաթիրախային ներուժը:

Հինգ լավագույն միացությունները հետազայում ուսումնասիրվել են 100 նանոկայրկյան տևողությամբ մոլեկուլային դինամիկայի (ՄԴ) մոդելավորման միջոցով՝ սպիտակուց-լիգանդ կոմպլեքսների դինամիկ կայունությունը, կառուցվածքային շեղումները (RMSD), Կուլտյան և Վան դեր Վաալսյան փոխազդեցության էներգիաները և ջրածնային կապերի առաջացումը գնահատելու նպատակով: ՄԴ արդյունքները հաստատեցին դոքինգի կանխատեսումները ցույց տալով, որ Միացություն 2-ը TRPC6-ի հետ ձևավորում է ջերմադինամիկորեն առավել կայուն և կոնֆորմացիոն առումով կոշտ կոմպլեքս: Դիագիլզիցերին-զգայուն ենթաընտանիքի սահմաններում սելեկտիվությունը (ընտրողականությունը) խստորեն հաստատելու նպատակով անցկացվել են համեմատական ՄԴ սիմուլյացիաներ՝ օգտագործելով անցուղիների տետրամերային մոդելներ, ներառյալ TRPC7-ի համար *de novo* գեներացված AlphaFold-Multimer մոդելը: Այս սիմուլյացիաները բացահայտեցին, որ Միացություն 2-ի փոխազդեցությունները TRPC3-ի և TRPC7-ի հետ ուղեկցվում են տարածական զգալի տատանումներով և կառուցվածքային անկայունությամբ, ինչն ապացուցում է դրա վառ արտահայտված և խիստ սելեկտիվությունը TRPC6-ի նկատմամբ:

ACHE-ի և BuChE-ի հետ փոխազդեցություններն ուսումնասիրելու նպատակով իրականացվել են լրացուցիչ մոլեկուլային դինամիկայի հետազոտություններ բացահայտելով թեկնածուների բազմազան ֆունկցիոնալ պրոֆիլը: Միացություն 3-ը և Միացություն 5-ը ցուցաբերեցին կայուն կապում երկու ֆերմենտների հետ՝ մատնանշելով հավասարակշռված երկակի (բիս-ֆունկցիոնալ) ինհիբիտորային հատկություններ: Միացություն 1-ը և Միացություն 4-ը դրսևորեցին խիստ սելեկտիվ և գերադասելի կապում BuChE-ի նկատմամբ: Մինչդեռ Միացություն 2-ը հիմնականում փոխազդում էր AChE-ի ծայրամասային անիոնային կայքի (PAS) հետ: Քանի որ հայտնի է, որ PAS-ը ներգրավված է բետա-ամիլոիդային ագրեգացիայի խթանման գործընթացում, կապման այս յուրահատուկ պրոֆիլը ցույց է տալիս, որ Միացություն 2-ը կարող է ունենալ հավելյալ հակամիլոիդոգեն մեխանիզմ՝ թիրախային խոլինեսթերազի արգելակմանը զուգահեռ:

Կառուցվածքով նման կենսաակտիվ մոլեկուլների հայտնաբերումը հեշտացնելու նպատակով, կիրառելով PharmaGist ծրագիրը, իրականացվել է լիգանդի վրա հիմնված ֆարմակոֆորային մոդելավորում՝ հիմնվելով օպտիմիզացված հինգ առաջատար միացությունների կառուցվածքային առանձնահատկությունների վրա: Ստեղծվել է երկու փոխլրացնող ֆարմակոֆորային մոդել: Առաջինը՝ բարձր ճշգրտության 6-կետանոց մոդելը, դրսևորեց խիստ սպեցիֆիկություն և ZINC տվյալների բազայի նպատակաորոշված վիրտուալ սքրինինգի ընթացքում հաջողությամբ բացահայտեց 44 խիստ համապատասխանող միացություններ: Երկրորդը՝ ավելի ընդհանրացված 4-կետանոց մոդելը, տվեց 334,196 պոտենցիալ համընկնում՝ դարձնելով այն խիստ պիտանի դիվերսիֆիկացված, լայնամասշտաբ վիրտուալ սքրինինգի համար: Միասին այս ֆարմակոֆորային մոդելներն ապահովում են հուսալի հաշվողական հենք՝ բազմաթիրախային պիպերազինային նոր ածանցյալների շարունակական ռացիոնալ նախագծման և հայտնաբերման համար:

STUDY OF THE INTERACTIONS OF DISUBSTITUTED PIPERAZINES AND THEIR
DERIVATIVES WITH SELECTED MOLECULAR TARGETS INVOLVED IN THE
PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

SUMMARY

Keywords: Alzheimer's disease, TRPC6, piperazine derivatives, molecular docking, molecular dynamics, pharmacophore modeling, AChE, BuChE, multitarget drugs, virtual screening, computer-aided drug design (CADD), neurodegenerative diseases.

The aim of this dissertation was to identify novel N,N-disubstituted piperazine derivatives with multitarget potential using modern computer-aided drug design (CADD) approaches. Given the complex, multifactorial nature of Alzheimer's disease (AD) pathogenesis, particular attention was focused on compounds capable of acting as positive modulators of the TRPC6 ion channel—to restore calcium homeostasis and promote synaptoprotection—while simultaneously exhibiting inhibitory activity toward acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). This multi-target-directed ligand (MTDL) strategy represents a highly promising approach for AD treatment.

A comprehensive, multi-step virtual screening strategy was applied to a massive chemical space of approximately 1.5×10^7 virtual compounds based on the N,N-disubstituted piperazine pharmacophore. This initial library was filtered down to 515 unique structures and rigorously evaluated for their physicochemical, pharmacokinetic, and toxicological properties using ADMET analysis. Applying Lipinski, Veber, and Ghose drug-likeness criteria, alongside predictions of passive gastrointestinal absorption, high blood-brain barrier (BBB) permeability, and overall safety profiles (lack of mutagenicity or hepatotoxicity), the selection was narrowed down to 211 drug-like molecules, from which 14 highly promising lead compounds were identified.

Molecular docking studies were subsequently performed against TRPC6, TRPC3, TRPC7, AChE, and BuChE. Interestingly, the docking results for TRPC6 revealed not only interactions within the classical central binding pocket but also the existence of a novel peripheral binding site, indicating a potential for allosteric modulation. The five strictly selected lead compounds demonstrated stable binding complexes specifically within the central pocket of TRPC6, perfectly reproducing the binding pattern of the natural reference activator, hyperforin, while exhibiting highly favorable binding energies. Furthermore, cross-docking revealed that these specific ligands also showed significant affinity toward both cholinesterases, confirming their robust multitarget potential.

The five highest-ranked compounds were further investigated using 100-nanosecond molecular dynamics (MD) simulations to evaluate the dynamic stability of the protein-ligand complexes, structural deviations (RMSD), Coulombic and van der Waals interaction energies, and critical hydrogen-bond formations. The MD results confirmed the docking predictions, demonstrating that Compound 2 formed the most thermodynamically stable and conformationally rigid complex with TRPC6. To rigorously validate selectivity within the diacylglycerol-sensitive subfamily, comparative MD simulations were conducted using

tetrameric channel models, including a de novo generated AlphaFold-Multimer model for TRPC7. These simulations revealed that interactions of Compound 2 with TRPC3 and TRPC7 were accompanied by significant spatial fluctuations and structural instability, thus proving its pronounced and strict selectivity toward TRPC6.

Additional molecular dynamics studies were performed to investigate the interactions with AChE and BuChE, unveiling a diverse functional profile among the candidates. Compound 3 and Compound 5 demonstrated stable binding to both enzymes, suggesting balanced dual (bis-functional) inhibitory properties. Compound 1 and Compound 4 exhibited highly selective and preferential binding toward BuChE. Meanwhile, Compound 2 primarily interacted with the peripheral anionic site (PAS) of AChE. Since PAS is known to be involved in the promotion of amyloid-beta aggregation, this specific binding profile indicates that Compound 2 may possess an additional anti-amyloidogenic mechanism alongside targeted cholinesterase inhibition.

To facilitate the discovery of structurally related bioactive molecules, ligand-based pharmacophore modeling was performed using the PharmaGist tool based on the structural features of the five optimized lead compounds. Two complementary pharmacophore models were generated. The first, a highly precise 6-point model, demonstrated strict specificity and successfully identified 44 highly matched compounds during a focused virtual screening of the ZINC database. The second, a more generalized 4-point model, yielded 334,196 potential hits, making it highly suitable for diversified, large-scale virtual screening. Together, these pharmacophore models provide a robust computational framework for the ongoing rational design and identification of novel multitarget piperazine derivatives.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'B. Liu', is located in the lower right quadrant of the page. The signature is fluid and cursive, with a large initial 'B' and a trailing 'Liu'.