

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



PHẠM ĐIỂM THU

**NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN MAO-B
NGƯỜI TÁI TỔ HỢP - ỨNG DỤNG
TRONG SÀNG LỌC CHẤT ỨC CHẾ
MAO-B**

Ngành: Dược lý – Dược lâm sàng

Mã số: 9720205

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Năm 2026

Công trình được hoàn thành tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Nguyễn Quốc Thái

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường

họp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp
- Thư viện Đại học

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Các bệnh thoái hóa thần kinh, đặc biệt là bệnh Parkinson và Alzheimer, đang trở thành gánh nặng y tế toàn cầu do xu hướng già hóa dân số. Trong đó, bệnh Parkinson đặc trưng bởi sự thoái hóa các tế bào thần kinh dopaminergic, dẫn đến suy giảm nồng độ dopamin và gây ra các rối loạn vận động nghiêm trọng. Enzym monoamin oxidase B (MAO-B) đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa dopamin; sự gia tăng hoạt tính của enzym này không chỉ làm giảm nồng độ dopamin mà còn tạo ra các sản phẩm oxy hóa gây stress oxy hóa, góp phần thúc đẩy quá trình thoái hóa thần kinh.

Ức chế chọn lọc MAO-B là một chiến lược điều trị hiệu quả nhằm bảo tồn dopamin và làm chậm tiến triển bệnh Parkinson. Tuy nhiên, cho đến nay chỉ có một số rất hạn chế các thuốc ức chế MAO-B được phê duyệt lâm sàng. Việc phát triển các chất ức chế mới gặp nhiều thách thức, đặc biệt là nguy cơ mất tính chọn lọc giữa MAO-B và MAO-A, dẫn đến các tác dụng không mong muốn nghiêm trọng.

Bên cạnh đó, các phương pháp sàng lọc hoạt tính truyền thống đòi hỏi chi phí cao và thời gian dài, gây hạn chế lớn trong điều kiện nghiên cứu trong nước. Do đó, việc ứng dụng các phương pháp sàng lọc ảo kết hợp trí tuệ nhân tạo, cùng với việc chủ động xây dựng hệ thống biểu hiện enzym MAO-B người tái

tổ hợp để phục vụ thử nghiệm sinh học, là hướng tiếp cận cần thiết, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

b. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu tổng quát: Nghiên cứu tích hợp đa phương pháp nhằm tìm kiếm, tổng hợp và xác nhận hoạt tính của các hợp chất ức chế chọn lọc MAO-B mới, có tiềm năng phát triển thành thuốc điều trị bệnh Parkinson.

Mục tiêu cụ thể:

- Xây dựng và ứng dụng các mô hình sàng lọc ảo (pharmacophore, QSAR, docking, mô phỏng động lực học phân tử và mô hình mạng nơ-ron tích chập) để tìm kiếm các chất ức chế MAO-B tiềm năng.
- Khảo sát điều kiện biểu hiện và đánh giá hoạt tính của enzym MAO-B người tái tổ hợp trên hệ thống nấm men *Pichia pastoris*.
- Tổng hợp các hợp chất tiềm năng được lựa chọn từ quá trình sàng lọc và đánh giá tác dụng ức chế MAO-B *in vitro*.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu của luận án bao gồm enzym MAO-B người và các hợp chất hóa học tiềm năng có khả năng ức chế chọn lọc enzym này.

Phương pháp nghiên cứu được triển khai theo hướng tích hợp, bao gồm:

- Các phương pháp *in silico* như xây dựng mô hình pharmacophore, QSAR, docking phân tử, mô phỏng động

lực học phân tử và mô hình học sâu dựa trên mạng nơ-ron tích chập để sàng lọc hợp chất.

- Các phương pháp sinh học phân tử nhằm biểu hiện và tinh sạch enzyme MAO-B người tái tổ hợp trên hệ thống *Pichia pastoris*.
- Các phương pháp tổng hợp hóa học và đánh giá hoạt tính ức chế enzyme MAO-B *in vitro*.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

Luận án đã xây dựng thành công một quy trình nghiên cứu tích hợp từ sàng lọc ảo, biểu hiện enzyme tái tổ hợp đến tổng hợp và kiểm chứng hoạt tính sinh học, góp phần làm phong phú cơ sở lý luận trong nghiên cứu phát triển thuốc ức chế MAO-B.

Về mặt thực tiễn, luận án đã:

- Xây dựng và ứng dụng hiệu quả các mô hình sàng lọc ảo kết hợp trí tuệ nhân tạo trong tìm kiếm chất ức chế MAO-B chọn lọc.
- Thiết lập thành công hệ thống biểu hiện enzyme MAO-B người tái tổ hợp có hoạt tính sinh học, góp phần giảm sự phụ thuộc vào các bộ kit thương mại đắt tiền.
- Phát hiện và xác nhận một số hợp chất tiềm năng có hoạt tính ức chế MAO-B *in vitro*, tạo tiền đề cho các nghiên cứu phát triển thuốc tiếp theo.

e. Bố cục của luận án

Luận án dài 149 trang, trong đó:

- Đặt vấn đề và mục tiêu nghiên cứu: 2 trang.

- Tổng quan tài liệu: 36 trang.
- Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: 22 trang.
- Kết quả nghiên cứu: 45 trang.
- Bàn luận: 41 trang.
- Kết luận: 2 trang.
- Kiến nghị và đóng góp mới của luận án: 1 trang

Luận án có 36 bảng, 32 hình và đồ thị, cùng 169 tài liệu tham khảo.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Enzym monoamin oxidase và vai trò trong bệnh lý thần kinh

Monoamin oxidase (MAO) là enzym nội bào, khu trú ở màng ngoài ty thể, đóng vai trò trung tâm trong điều hòa nồng độ các chất dẫn truyền thần kinh monoamin thông qua phản ứng khử amin oxy hóa [1–4]. Ở người, MAO tồn tại dưới hai đồng dạng là MAO-A và MAO-B, có sự khác biệt về cấu trúc, phân bố mô và tính đặc hiệu cơ chất.

MAO-B phân bố chủ yếu ở não, đặc biệt trong các tế bào thần kinh đệm, và tham gia trực tiếp vào quá trình chuyển hóa dopamin. Trong bệnh Parkinson, sự gia tăng hoạt tính MAO-B không chỉ làm suy giảm nồng độ dopamin mà còn tạo ra các sản phẩm phụ phản ứng như hydrogen peroxide và aldehyd, góp phần gây stress oxy hóa và thoái hóa tế bào thần kinh [5–9]. Do đó, MAO-B được xem là một đích tác dụng quan trọng trong chiến lược điều trị bệnh Parkinson.

2.2. Các chất ức chế MAO-B và mối liên hệ cấu trúc – tác dụng

Các chất ức chế MAO-B đã và đang được nghiên cứu thuộc nhiều nhóm cấu trúc khác nhau như propargylamin, coumarin, chalcone, indole, benzamid và các hợp chất dị vòng thơm [10–25]. Trong số đó, selegilin, rasagilin và safinamid là các thuốc ức chế MAO-B đã được ứng dụng trên lâm sàng, tuy nhiên vẫn tồn tại các hạn chế về tác dụng phụ và tương tác thuốc – thức ăn khi sử dụng kéo dài.

Nhiều nghiên cứu SAR cho thấy hoạt tính và tính chọn lọc của các chất ức chế MAO-B phụ thuộc mạnh vào khả năng hình thành các tương tác kỵ nước, liên kết hydro và tương tác π – π với các acid amin trong khoang hoạt động của enzym [26–33]. Cấu trúc khoang hoạt động của MAO-B gồm khoang gắn cơ chất và khoang cửa, được ngăn cách bởi một vòng acid amin linh động, là cơ sở quan trọng để thiết kế các chất ức chế chọn lọc so với MAO-A.

Các dẫn xuất benzamid đã được chứng minh là nhóm hợp chất tiềm năng trong nghiên cứu phát triển chất ức chế MAO-B chọn lọc. Nghiên cứu của Tzvetkov và Nikolay đã báo cáo một số dẫn xuất benzamid thể hiện hoạt tính ức chế MAO-B đáng chú ý [146]. Bên cạnh đó, Ahmed Elkamhawy và cộng sự ghi nhận một dẫn xuất benzamid có $IC_{50} = 42$ nM và chỉ số chọn lọc (SI) > 2.375 , cao hơn nhiều lần so với rasagilin [147]. Ngoài ra, các dẫn xuất quinolin dựa trên khung cấu trúc của safinamid cũng cho thấy tiềm năng lớn, điển hình là hợp chất (R)-3-F-

benzyloxytetrahydroisoquinolin với $IC_{50} = 17$ nM và $SI = 2.941$ [149].

2.3. Các phương pháp sàng lọc ảo trong nghiên cứu phát triển thuốc

Sàng lọc ảo là công cụ quan trọng trong nghiên cứu phát triển thuốc hiện đại, cho phép sàng lọc nhanh các ngân hàng dữ liệu hợp chất lớn với chi phí thấp. Các phương pháp phổ biến bao gồm mô hình pharmacophore, QSAR và docking phân tử [34–52].

Trong nghiên cứu MAO-B, các mô hình 3D-pharmacophore và 2D-QSAR thường được xây dựng từ các tập hợp hợp chất có hoạt tính đã được công bố. Tập dữ liệu gồm 397 hợp chất có giá trị IC_{50} thực nghiệm trên MAO-B, thu thập từ các công trình đã công bố [114–135], được sử dụng rộng rãi để xây dựng và đánh giá các mô hình sàng lọc truyền thống.

Docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử cung cấp thông tin quan trọng về cơ chế gắn kết và độ ổn định của phức hợp protein – phối tử, góp phần lý giải mối liên hệ cấu trúc – tác dụng và hỗ trợ lựa chọn các hợp chất tiềm năng.

2.4. Ứng dụng trí tuệ nhân tạo trong sàng lọc chất ức chế MAO-B

Sự phát triển của trí tuệ nhân tạo (AI), đặc biệt là các mô hình học máy và học sâu, đã mở ra hướng tiếp cận mới trong sàng lọc và thiết kế thuốc. Các mô hình mạng nơ-ron tích chập (CNN) có khả năng tự động trích xuất đặc trưng từ dữ liệu cấu trúc phân

từ, giúp nâng cao độ chính xác trong dự đoán hoạt tính và tính chọn lọc của hợp chất [53–70].

Nhiều nghiên cứu gần đây cho thấy việc kết hợp các phương pháp sàng lọc ảo truyền thống với các mô hình học sâu giúp cải thiện đáng kể hiệu suất sàng lọc, giảm tỷ lệ dương tính giả và tăng khả năng phát hiện các hợp chất tiềm năng. Tuy nhiên, việc xây dựng và hiệu chỉnh các mô hình AI đòi hỏi dữ liệu chất lượng cao và chiến lược đánh giá phù hợp.

2.5. Biểu hiện enzym MAO-B người tái tổ hợp và đánh giá hoạt tính *in vitro*

Để xác nhận hoạt tính sinh học của các hợp chất tiềm năng, việc xây dựng hệ thống biểu hiện enzym MAO-B người tái tổ hợp là bước quan trọng. Hệ thống nấm men *Pichia pastoris* được sử dụng rộng rãi nhờ khả năng biểu hiện protein ngoại lai với mức độ cao, chi phí hợp lý và khả năng thực hiện các biến đổi sau dịch mã cần thiết [71–85].

Các phương pháp đánh giá hoạt tính ức chế MAO-B *in vitro* thường dựa trên việc theo dõi sự thay đổi tín hiệu quang phổ liên quan đến quá trình oxy hóa cơ chất. Tuy nhiên, các bộ kit thương mại thường có chi phí cao và phụ thuộc nguồn cung, gây khó khăn cho việc triển khai nghiên cứu lâu dài.

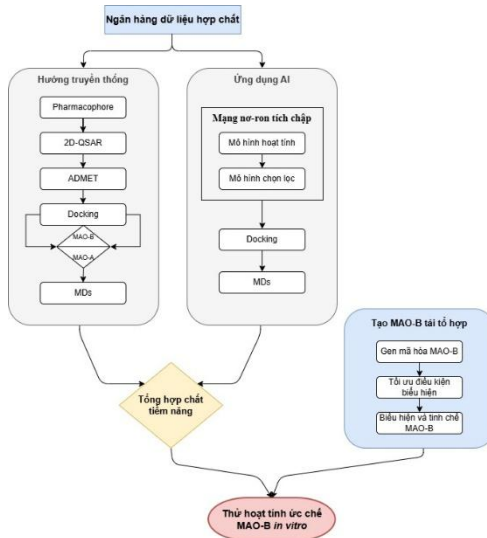
Từ tổng quan tài liệu cho thấy, mặc dù đã có nhiều nghiên cứu về chất ức chế MAO-B, nhưng vẫn còn khoảng trống lớn trong việc phát triển các hợp chất mới có tính chọn lọc cao, hiệu quả và an toàn hơn. Việc tích hợp các phương pháp sàng lọc ảo tiên tiến với hệ thống biểu hiện enzym tái tổ hợp và thử

nghiệm sinh học *in vitro* là hướng tiếp cận hợp lý và có nhiều tiềm năng.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Thiết kế nghiên cứu

Quy trình nghiên cứu được triển khai theo chuỗi tích hợp gồm: xây dựng mô hình sàng lọc ảo, lựa chọn các hợp chất tiềm năng, biểu hiện và tinh sạch enzym MAO-B người tái tổ hợp, tổng hợp hợp chất và đánh giá hoạt tính ức chế enzym *in vitro*.



Sơ đồ quy trình nghiên cứu

3.2. Đối tượng nghiên cứu

- Enzym monoamin oxidase B (MAO-B) người tái tổ hợp.

- Các hợp chất hóa học tiềm năng có khả năng ức chế chọn lọc MAO-B, được lựa chọn từ quá trình sàng lọc ảo trên các ngân hàng dữ liệu hóa học.
- Các chủng vi sinh vật và hệ thống sinh học phục vụ cho biểu hiện và đánh giá hoạt tính enzym.

3.3. Phương pháp sàng lọc ảo (*in silico*)

3.3.1. Xây dựng và đánh giá mô hình pharmacophore

Các mô hình 3D-pharmacophore được xây dựng theo hai hướng: dựa trên cấu trúc protein và dựa trên phối tử đã biết. Các mô hình được đánh giá thông qua khả năng phân biệt chất có hoạt tính và không hoạt tính bằng các chỉ số thống kê phù hợp. Mô hình có hiệu suất cao nhất được lựa chọn để sàng lọc các ngân hàng dữ liệu hợp chất lớn.

3.3.2. Xây dựng mô hình QSAR

Mô hình QSAR hai chiều (2D-QSAR) được xây dựng nhằm khảo sát mối liên hệ định lượng giữa các thông số mô tả cấu trúc phân tử và hoạt tính ức chế MAO-B. Các mô hình được đánh giá thông qua các tham số thống kê và miền ứng dụng để đảm bảo độ tin cậy khi dự đoán các hợp chất mới.

3.3.3. Docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử

Các hợp chất được docking vào vị trí hoạt động của MAO-B và MAO-A nhằm đánh giá khả năng gắn kết và tính chọn lọc. Những hợp chất có kết quả docking tốt được tiếp tục khảo sát bằng mô phỏng động lực học phân tử để đánh giá độ ổn định của phức hợp protein – phối tử theo thời gian, thông qua các chỉ số như RMSD, RMSF và bán kính quay.

3.3.4. Ứng dụng mô hình học sâu

Mô hình mạng nơ-ron tích chập (CNN) được xây dựng và huấn luyện nhằm dự đoán hoạt tính và tính chọn lọc của các hợp chất đối với MAO-B. Kết quả từ mô hình CNN được kết hợp với các phương pháp sàng lọc truyền thống nhằm tăng độ chính xác và giảm tỷ lệ dương tính giả trong quá trình lựa chọn hợp chất tiềm năng.

3.4. Biểu hiện và tinh sạch enzym MAO-B người tái tổ hợp

Gen mã hóa MAO-B người được biểu hiện trên hệ thống nấm men *Pichia pastoris*. Các điều kiện cảm ứng, phá tế bào và tinh sạch protein được khảo sát nhằm thu nhận enzym MAO-B có độ tinh khiết và hoạt tính sinh học phù hợp. Enzym sau tinh sạch được kiểm tra bằng các phương pháp điện di và phân tích miễn dịch để xác nhận kích thước và tính đặc hiệu.

3.5. Tổng hợp các hợp chất tiềm năng

Trên cơ sở kết quả sàng lọc ảo, một số hợp chất tiềm năng và các dẫn xuất của chúng được lựa chọn để tổng hợp. Quá trình tổng hợp được thực hiện theo các quy trình hóa học phù hợp, đảm bảo độ tinh khiết của sản phẩm trước khi tiến hành đánh giá hoạt tính sinh học.

3.6. Đánh giá hoạt tính ức chế MAO-B *in vitro*

Hoạt tính ức chế enzym MAO-B được đánh giá *in vitro* thông qua việc theo dõi sự thay đổi tín hiệu quang phổ liên quan đến phản ứng oxy hóa cơ chất. Các thông số như độ dốc phản ứng, phần trăm ức chế và giá trị IC_{50} được xác định để so sánh

hiệu lực của các hợp chất nghiên cứu. Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại nhằm đảm bảo độ tin cậy của kết quả.

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1. Xây dựng mô hình sàng lọc ảo truyền thống và áp dụng sàng lọc các chất ức chế MAO-B chọn lọc

4.1.1. Xây dựng và đánh giá các mô hình 3D-pharmacophore

Nghiên cứu đã tiến hành xây dựng các mô hình 3D-pharmacophore dựa trên cấu trúc protein và cấu trúc phối tử. Pharmacophore dựa trên cấu trúc: Từ phức hợp MAO-B và safinamid (PDB ID: 2V5Z), ba mô hình S01, S02 và S03 đã được thiết lập dựa trên các tương tác kỵ nước, cho hydro và nhận hydro. Pharmacophore dựa trên phối tử: Sử dụng tập xây dựng gồm 4 hợp chất, phần mềm LigandScout đã tạo ra các mô hình từ L01 đến L04. Mô hình L04 đã được chọn do tỷ lệ hoạt tính (Ya) cao nhất (0,9783).

4.1.1. Xây dựng và thẩm định mô hình 2D-QSAR

Mô hình 2D-QSAR được xây dựng có hệ số tương quan $R^2 = 0,88$ và căn bậc hai của tổng bình phương các phần dư $RMSE = 0,42$. Phương trình mô hình 2D-QSAR thu được như sau: $pIC_{50} = 6,69709 - (0,31977 a_{nH}) - (0,04221 a_{nN}) + (1,34494 GCUT_PEOE_0) - (0,54578 h_{pKa}) + (1,00641 h_{pKb}) - (2,22940 PEOE_VSA+3) - (0,60484 R_{synth})$

Đánh giá mô hình: Các chỉ số đánh giá nội ($Q^2 > 0,5$) và ngoại ($R^2_{pred} > 0,5$) đều thỏa mãn trên tất cả các bộ dữ liệu khảo

sát. Kết quả phân tích Roy với $r_m^2 > 0,5$ và $\Delta r_m^2 < 0,2$ đã khẳng định khả năng dự đoán ổn định của mô hình trên toàn tập dữ liệu.

4.2. Ứng dụng mạng nơ-ron tích chập (CNN) trong sàng lọc các chất ức chế MAO-B

4.2.1. Xây dựng mô hình CNN hoạt tính và chọn lọc

Mô hình hoạt tính: Cấu hình tối ưu được xác định gồm 256 nơ-ron, 30 epoch, tốc độ học 0,0005 và tỷ lệ dropout 0,6. Mô hình đạt độ chính xác 0,82 và chỉ số AUC là 0,88.

Mô hình chọn lọc: Được thiết lập để ưu tiên các chất ức chế đặc hiệu trên MAO-B, mô hình này đạt hiệu suất với độ đúng 0,84 và AUC 0,88.

4.2.2. Kết quả sàng lọc ảo quy mô lớn

Quá trình sàng lọc được thực hiện trên cơ sở dữ liệu ChemDiv với quy trình nghiêm ngặt qua nhiều lớp lọc. Từ 1.459.919 hợp chất ban đầu, mô hình hoạt tính lọc được 214.587 chất, và sau đó mô hình chọn lọc tiếp tục giữ lại 60.257 chất tiềm năng. Sau khi đánh giá ADMET, 46.410 hợp chất thỏa mãn các ngưỡng rủi ro đã được đưa vào phân tích docking.

4.2.3. Docking phân tử và khả năng xuyên qua hàng rào máu não

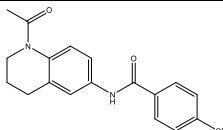
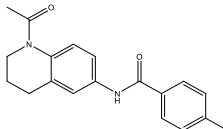
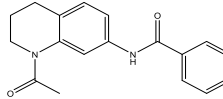
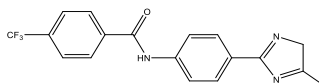
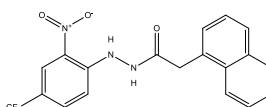
Docking chọn lọc: Nghiên cứu đã xác định được 7 hợp chất tiềm năng nhất có ái lực liên kết mạnh với MAO-B nhưng yếu với MAO-A. Chênh lệch điểm số docking (ΔDS) cao nhất đạt 46,4 kJ/mol (chất G502-0026 và T226-1029).

Đánh giá tính thấm qua hàng rào máu não: Thông qua mô hình BOILED-Egg, 3 hợp chất G502-0026, T226-1029 và

V014-9312 được dự đoán có khả năng hấp thu thụ động qua đường tiêu hóa và vượt qua hàng rào máu não.

4.3.2. Tổng hợp các chất tiềm năng

Dựa trên kết quả sàng lọc và điều kiện thực tế của phòng thí nghiệm, nghiên cứu đã tập trung tổng hợp thành công các cấu trúc tiêu biểu.

Hợp chất	Cấu trúc
G502-0026 [N-(1-acetyl-3,4-dihydro-2H-quinolin-6-yl)-4-(trifluoromethyl)benzamid]	
Dẫn xuất fluoro của G502-0026 [N-(1-acetyl-3,4-dihydro-2H-quinolin-7-yl)-4-(trifluoromethyl)benzamid]	
Đồng phân amid của G502-0026 [N-(1-acetyl-3,4-dihydro-2H-quinolin-7-yl)-4-(trifluoromethyl)benzamid]	
G851 – 0627 [N-(4-(5-methyl-4H-imidazol-2-yl)phenyl)-4-(trifluoromethyl)benzamid]	
ZINC21285023 [2-(naphthalen-1-yl)-N'-(2-nitro-4-(trifluoromethyl)phenyl)acetohydrazid]	

4.4. Biểu hiện và tinh sạch enzym MAO-B người tái tổ hợp

Quá trình nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình biểu hiện và tinh sạch enzym MAO-B người tái tổ hợp trên hệ

thống nấm men *Pichia pastoris*, đạt độ tinh sạch và hoạt tính cao phục vụ cho các thử nghiệm ức chế.

4.4.1. Khảo sát điều kiện sinh trưởng và biểu hiện trên *Pichia pastoris*

Giai đoạn tăng sinh khối: Qua khảo sát đường cong sinh trưởng, chủng nấm men đạt pha log mạnh mẽ nhất từ giờ thứ 4 đến thứ 12. Thời điểm 8 giờ được lựa chọn để chuyển môi trường vì tế bào đang ở giữa pha tăng trưởng, có hoạt tính trao đổi chất mạnh nhất và chưa chịu tác động tiêu cực từ việc cạn kiệt dinh dưỡng.

Lựa chọn hệ môi trường: Mặc dù môi trường giàu dinh dưỡng (BMGY–BMMY) cho sinh khối cao gấp 5,5 lần, nhưng môi trường tối thiểu (BMG–BMM) mới là điều kiện cho hoạt tính enzym MAO-B tối ưu. Hoạt tính ghi nhận được trong môi trường tối thiểu đạt 536,68 U/L, cao gấp 5 lần so với môi trường giàu dinh dưỡng.

Điều kiện cảm ứng: Nồng độ methanol 0,5% (bổ sung mỗi 12 giờ) được xác định là điểm tối ưu để kích hoạt promoter AOX1 mà không gây độc cho tế bào. Thời gian cảm ứng tốt nhất là 24 giờ, đạt hoạt tính cực đại 755,47 U/L. Kéo dài thời gian hơn sẽ làm suy giảm chất lượng enzym do hiện tượng biến tính hoặc thoái hóa nội bào.

4.4.2. Hiệu suất phá tế bào và tinh sạch enzym

Quy trình phá tế bào và tinh sạch qua cột sắc ký đã được tối ưu hóa để giải phóng tối đa enzym bám màng và loại bỏ protein tạp.

Tối ưu hóa phá tế bào: Sử dụng tác động cơ học của bi thủy tinh với điều kiện 6 chu kỳ (mỗi chu kỳ 6 phút phá, 10 phút nghỉ trong đá) giúp đạt nồng độ protein bão hòa tại 4,05 mg/mL.

Hòa tan màng và tinh sạch: Enzym MAO-B liên kết màng được hòa tan hiệu quả bằng chất hoạt động bề mặt Triton X-100. Quá trình tinh sạch bằng sắc ký trao đổi anion trên cột HiTrap Q FF cho thấy enzym tập trung chủ yếu ở phân đoạn rửa giải 30% và 40% đệm High-QB.

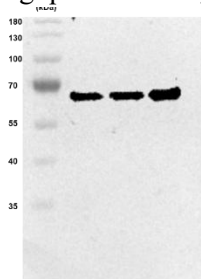
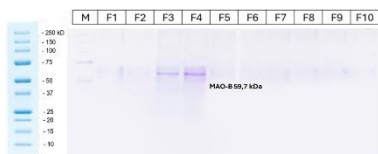
	Thể tích (mL)	Nồng độ protein (mg/mL)	Tổng protein (mg)	Hoạt tính (U/L)	Tổng hoạt tính (U)	Hoạt độ riêng (U/mg protein)	Hiệu suất (%)
Dịch phá tế bào	40	3,11	124,4	770	30,8	0,25	100
Dịch Triton hòa tan màng tế bào*	6	8,33	49,98	4.371	26,2	0,52	85,06
F3 và F4 sau khi cô đặc	0,5	5,86	2,93	9.983	4,99	1,7	16,21

*Dịch Triton: dịch hòa tan màng tế bào sau ly tâm

Sau quá trình cô đặc, hoạt tính enzym đạt 9.983 U/L. Tổng lượng MAO-B tái tổ hợp thu được đạt 1,41 mg. Đây là nguồn nguyên liệu chất lượng cao, sẵn sàng cho các nghiên cứu sàng lọc hoạt chất ức chế tiếp theo.

Định danh và độ tinh sạch: Điện di SDS-PAGE và Western blot xác nhận sự hiện diện của một băng protein duy nhất bắt cặp đặc hiệu với kháng thể kháng MAO-B tại vị trí ~60 kDa (phù hợp với khối lượng lý thuyết 59,7 kDa). Tín hiệu băng

mạnh, đồng nhất và không có băng phụ chứng tỏ enzyme thu được có độ tinh sạch cao, không bị đứt gãy trong quá trình xử lý.



Kết quả điện di SDS – PAGE các phân đoạn tinh sạch MAO-B

Kết quả phân tích Western blot của enzyme MAO-B người sau tinh sạch

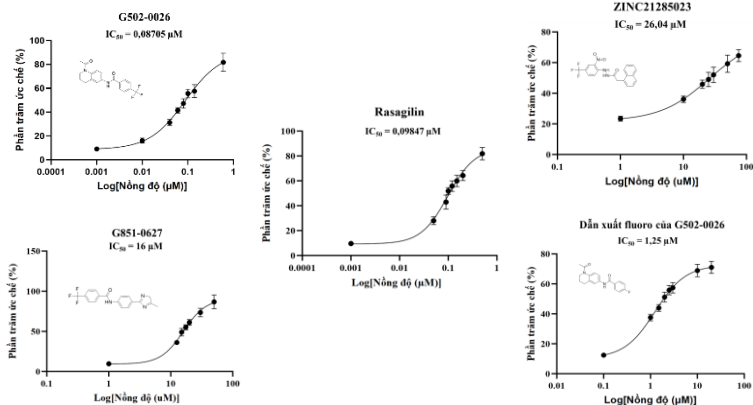
4.5. Đánh giá tác dụng ức chế MAO-B *in vitro* của các chất tiềm năng

Sau giai đoạn sàng lọc ảo và tổng hợp hóa học, nghiên cứu thực hiện khảo sát tác dụng ức chế MAO-B *in vitro* trên enzym tái tổ hợp cho 5 hợp chất: (1) G502-0026, (2) dẫn xuất fluoro của G502-0026, (3) đồng phân vị trí nhóm amid của G502-0026, (4) G851-0627 và (5) ZINC21285023. Các phản ứng được đo động học và ước tính giá trị IC_{50} bằng mô hình phi tuyến 4 tham số. Tất cả các giá trị được biểu thị dưới dạng trung bình \pm độ lệch chuẩn của ba phép đo độc lập ($n=3$). Kết quả khảo sát nồng độ ức chế trung bình của các chất được tổng hợp và chất đối chiếu rasagilin được tổng hợp được thể hiện dưới đây.

Chất khảo sát	IC_{50} (μM)
Rasagilin	0,09847
G502-0026	0,0875
Dẫn xuất fluoro của G502-0026	1,25
Đồng phân vị trí amid của G502-0026	Không ghi nhận tác dụng ức chế ở nồng độ $< 90 \mu M$

Chất khảo sát	IC ₅₀ (μM)
G851-0627	16
ZINC21285023	26,04

Hợp chất G502-0026 thể hiện hoạt tính ức chế MAO-B mạnh với giá trị IC₅₀ là 0,0875 μM. Trong cùng điều kiện thử nghiệm, hoạt tính của G502-0026 tương đương rasagilin (IC₅₀ = 0,09847 μM). Tại nồng độ 0,6 μM, G502-0026 ức chế 81,83% hoạt tính enzym MAO-B. Khi thay thế nhóm trifluoromethyl bằng nhóm fluoro, giá trị IC₅₀ tăng lên 1,25 μM. Thay đổi vị trí nhóm amid làm mất hoạt tính ức chế enzym ở nồng độ khảo sát (IC₅₀ > 90 μM).



**Đồ thị biểu diễn liên quan phần trăm ức chế với nồng độ
ức chế của các chất tổng hợp**

5. BÀN LUẬN

5.1. Sàng lọc in silico chất ức chế MAO-B chọn lọc

5.1.1. Hướng sàng lọc truyền thống và mô hình 2D-QSAR

Kết quả nghiên cứu cho thấy các mô hình pharmacophore dựa trên phối tử, đặc biệt là mô hình L04, có độ nhạy và độ chính xác cao hơn so với các mô hình dựa trên cấu trúc protein. Mô hình L04 nổi bật với tỷ lệ hoạt tính đạt 0,9783, cho phép bao quát được nhiều hợp chất ức chế tiềm năng nhờ sự kết hợp đa dạng các điểm tương tác kỵ nước, vòng thơm và liên kết hydro. Điều này chứng minh rằng việc mô phỏng các đặc trưng đặc thù của phối tử là chìa khóa để lọc ra số lượng lớn các chất có hoạt tính tiềm năng.

Song song với pharmacophore, mô hình 2D-QSAR được xây dựng từ 7 thông số mô tả quan trọng (a_{NH} , a_{NN} , GCUT_PEOE_0, h_{pKa} , h_{pKb} , VSA+3, Rsynth) đã thể hiện mối tương quan rất cao giữa giá trị pIC_{50} thực nghiệm và dự đoán với $R^2 = 0,88$. Phân tích sâu hơn về các thông số này giúp hiểu rõ cơ chế hoạt động ở cấp độ phân tử: thông số GCUT_PEOE_0 cho thấy phân bố điện tích đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định liên kết giữa phối tử và vùng hoạt động của enzym. Đáng chú ý, thông số Rsynth có hệ số âm gợi ý rằng những cấu trúc có hoạt tính ức chế mạnh thường có cấu tạo phức tạp, khó tổng hợp hơn các cấu trúc đơn giản. Mặc dù mô hình 2D-QSAR có ưu điểm dễ thực hiện và áp dụng được cho các chất chưa có cấu trúc tinh thể, nó vẫn tồn tại hạn chế là chưa tính đến các yếu tố hình học ba chiều hay linh động phân tử.

5.1.2. Đánh giá ADMET và docking phân tử

Quá trình sàng lọc ADMET đã loại bỏ những chất không phù hợp về dược động học và độc tính. Trong các cơ sở dữ liệu được khảo sát, ZINC là tập dữ liệu ấn tượng nhất với tỷ lệ vượt qua đạt 82,8%, phản ánh sự phong phú và tính khả thi cao của các hợp chất này khi làm thuốc. Ngược lại, các hợp chất từ y học cổ truyền Trung Hoa (TCM) gặp khó khăn trong việc hấp thu (chỉ 43% đạt yêu cầu), có thể do bản chất là các phân tử tự nhiên khó đi qua màng tế bào.

Kết quả docking phân tử cho thấy một tỷ lệ nhỏ các hợp chất có điểm số docking rất âm (dưới -30 kJ/mol), hứa hẹn khả năng gắn kết mạnh mẽ với MAO-B. Bằng cách thực hiện docking kép trên cả MAO-B và MAO-A, nghiên cứu đã chọn lọc được 1.905 hợp chất có tính đặc hiệu cao, không gây tác động ngoài đích.

5.1.3. Ứng dụng mô hình mạng nơ-ron tích chập (CNN)

Luận án xây dựng thành công hai mô hình CNN với độ chính xác cao (0,82 và 0,84) dựa trên nền tảng DEEPScreen. Khác với các nghiên cứu tổng quát, mô hình này được tối ưu hóa chuyên biệt cho MAO-B thông qua việc tinh chỉnh các siêu tham số như số lượng nơ-ron (256), tốc độ học (0,0005) và tỷ lệ dropout (0,6). Ưu điểm lớn nhất của cách tiếp cận này là khả năng tự động trích xuất đặc trưng từ hình ảnh cấu trúc 2D và quy trình tiền xử lý nghiêm ngặt bằng RDKit, giúp loại bỏ các sai số về hướng và xoay phân tử. Dù bộ dữ liệu huấn luyện còn khiêm tốn so với các nghiên cứu quốc tế, việc kết hợp CNN với docking và

mô phỏng động học phân tử (MD) đã xác định được 7 ứng viên tiềm năng có khả năng tương tác thuận lợi với lòng thóm tạo bởi Tyr435 và Tyr398 trong khoang gắn kết của MAO-B.

5.2. Tối ưu hóa biểu hiện MAO-B người trên nấm men *Pichia pastoris*

5.2.1. Lựa chọn hệ thống biểu hiện và kiểu hình MutS

Luận án đã lựa chọn chủng *Pichia pastoris* KM71 (kiểu hình Mut^S) để biểu hiện MAO-B người. Hệ thống này khắc phục được nhược điểm của *E. coli* – nơi protein thường tồn tại ở dạng thể vùi không hoạt tính và thiếu FAD. So với *S. cerevisiae*, *P. pastoris* giúp tránh được hiện tượng hyperglycosyl hóa và đảm bảo vùng C-tận của protein được bảo toàn, vốn là yếu tố then chốt để neo enzym vào màng ty thể. Kiểu hình Mut^S với tốc độ oxy hóa methanol chậm đã tạo điều kiện cho các chaperon có đủ thời gian xử lý và gấp cuộn các protein màng phức tạp như MAO-B, đồng thời hạn chế sự tích tụ của các sản phẩm phụ độc hại như formaldehyd

5.2.2. Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy và cảm ứng

Môi trường tối thiểu (BMG-BMM) dù cho sinh khối thấp hơn môi trường phức hợp (BMGY-BMMY) nhưng lại mang lại hoạt tính enzym cao hơn gấp 5 lần (536,68 U/L so với 110,29 U/L). Điều này cho thấy trong môi trường tối thiểu, tế bào phân bổ nguồn lực hiệu quả hơn cho việc tổng hợp và gắn cofactor FAD thay vì ưu tiên tăng sinh. Nồng độ methanol 0,5% được xác định là điểm cân bằng lý tưởng để duy trì promoter AOX1 mà không gây stress oxy hóa làm hỏng protein. Ngoài ra, thời gian

cảm ứng 24 giờ cho hoạt tính cao nhất; việc kéo dài thời gian sau đó dẫn đến giảm hoạt tính do tác động của protease nội bào và sự mất mát cofactor FAD trong môi trường oxy hóa kéo dài.

5.2.3. Khảo sát phá tế bào và tinh sạch protein

Do thành tế bào nấm men rất bền vững, phương pháp cơ học bằng bi thủy tinh đã được tối ưu hóa với 6 chu kỳ (6 phút phá và 10 phút nghỉ trong đá) để giải phóng tối đa protein nội bào mà không làm biến tính do nhiệt. Quy trình tinh sạch hai bước gồm hòa tan màng bằng Triton X-100 và sắc ký trao đổi anion đã thu được MAO-B có độ tinh sạch tăng 6,8 lần. Kết quả Western blot và phổ hấp thụ tại 456 nm xác nhận enzym thu được ở dạng homoenzym (chứa FAD) với khối lượng 59,7 kDa, hoàn toàn phù hợp với lý thuyết. Mặc dù hiệu suất thu hồi còn hạn chế (16,21%), quy trình này đã giúp giảm chi phí sản xuất enzym xuống dưới 100 USD/mg so với mức giá hàng ngàn USD khi nhập khẩu.

5.3. Hoạt tính ức chế và mối quan hệ cấu trúc - hoạt tính (SAR)

5.3.1. Hiệu lực của hợp chất dẫn đầu G502-0026

Trong số các hợp chất thử nghiệm, G502-0026 là ứng viên sáng giá nhất với giá trị IC_{50} đạt 0,0875 μ M, tương đương với thuốc đối chứng rasagilin (0,0985 μ M). Sự tương đương này chứng minh hiệu quả của chiến lược thiết kế dựa trên khung dihydroquinolin. Kết quả này cũng vượt trội hơn hẳn so với lazabemid, một chất từng thất bại trong thử nghiệm lâm sàng.

5.3.2. Phân tích các yếu tố cấu trúc quyết định (SAR)

Phân tích SAR cho thấy ba yếu tố then chốt quyết định hoạt tính ức chế MAO-B: (1) Nhóm trifluoromethyl (-CF₃): Việc thay thế -CF₃ bằng -F làm hoạt tính giảm tới 14 lần. Nhóm -CF₃ không chỉ tăng tính kỵ nước mà còn chiếm không gian tốt hơn trong túi kỵ nước của enzym, tạo ra các tương tác Van der Waals và tương tác π - π mạnh hơn. (2) Vị trí nhóm amid: Sự thay đổi vị trí gắn amid từ vị trí 6 sang vị trí 7 trên khung dihydroquinolin làm mất hoàn toàn hoạt tính (IC₅₀ > 90 μ M). Điều này khẳng định yêu cầu khắt khe về định hướng không gian trong trung tâm hoạt động dạng ống hẹp của MAO-B. (3) Khung dihydroquinolin cứng nhắc: G502-0026 có khung cấu trúc cứng nhắc giúp giảm mất entropy khi gắn kết, tạo ra sự ổn định cao hơn hẳn so với khung phenyl-imidazol linh động của G851-0627 hay mạch acetohydrazid của ZINC21285023.

6. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

6.1. Kết luận

Nghiên cứu đã hoàn thành các mục tiêu đề ra, bao gồm việc thiết kế, sàng lọc, tổng hợp và đánh giá hoạt tính sinh học của các hợp chất ức chế chọn lọc MAO-B, đồng thời làm chủ quy trình biểu hiện enzym MAO-B người tái tổ hợp. Thông qua hai hướng tiếp cận *in silico*, luận án đã xác định được nhiều ứng viên tiềm năng; trong đó, hướng truyền thống tìm ra 6 hợp chất có năng lượng liên kết tương đương safinamid. Hướng sử dụng mô hình học sâu CNN xác định được 7 hợp chất chủ đạo thuộc khung

quinolin, quinoxalin và benzamid có khả năng tương tác mạnh, chọn lọc với MAO-B.

Về thực nghiệm thực tế, hợp chất G502-0026 được xác định là ứng viên triển vọng nhất với hoạt tính ức chế mạnh nhất ($IC_{50} = 0,0875 \mu M$). Quá trình nghiên cứu các dẫn xuất đã chứng minh rõ rệt vai trò của nhóm trifluoromethyl và tính định hướng không gian của nhóm amid đối với khả năng gắn kết enzym. Bên cạnh đó, các hợp chất G851-0627 và ZINC21285023 cũng đã được tổng hợp và xác nhận hoạt tính ức chế *in vitro*. Tất cả các cấu trúc đều được minh chứng độ tin cậy thông qua hệ thống phổ MS và NMR.

Song song với việc tìm kiếm hợp chất, nghiên cứu đã biểu hiện thành công enzym MAO-B người tái tổ hợp trong chủng nấm men *Pichia pastoris* KM71. Các điều kiện cảm ứng đã được tối ưu hóa với nồng độ methanol 0,5% trong 24 giờ cùng quy trình phá tế bào nghiêm ngặt trong môi trường lạnh. Sau các bước tinh sạch bằng sắc ký trao đổi ion, luận án đã thu được 1,41 mg enzym MAO-B tinh khiết, có vạch đặc trưng rõ ràng trên Western blot, đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu được lý sâu hơn.

6.2. Kiến nghị

Luận án đề xuất một số hướng phát triển tiếp theo nhằm nâng cao hiệu quả nghiên cứu. Đầu tiên có thể nâng cấp quy trình biểu hiện enzym từ quy mô bình lắc lên hệ thống fermentor và thử nghiệm thêm các cột sắc ký khác nhau để tăng hiệu suất thu hồi và độ tinh khiết. Quy trình tổng hợp hóa học cũng cần được

cải tiến điều kiện phản ứng và khảo sát các phương pháp amid hóa mới. Ngoài ra, việc xây dựng hệ thống đánh giá *in vitro* chuẩn hóa bằng enzym tái tổ hợp và mở rộng biểu hiện MAO-A sẽ tạo tiền đề cho việc phát triển các thuốc điều trị Parkinson thế hệ mới dựa trên các khung quinolin và benzamid đã xác định.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA
TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. K.-M. Thai, D.-T. Pham, T.-M Ngo, H.-T. Nguyen, P.-V. Nguyen, T.-Q. Pham, D.-N. Nguyen, Q.-T. Nguyen & M.-T. Le (2025) Targeting MAO-B selectivity: computational screening, docking, and molecular dynamics insights, SAR and QSAR in Environmental Research, 36:7, 583-619, DOI: 10.1080/1062936X.2025.25372
2. Phạm Diễm Thu, Phùng Thị Bích Loan, Bùi Minh Hiếu, Vũ Thanh Thảo, Nguyễn Quốc Thái, Thái Khắc Minh. Khảo sát điều kiện biểu hiện monoamin oxidase B người trên *Pichia pastoris*. *Tạp chí Y học Công đồng*. 2025;66(14). doi:10.52163/yhc.v66iCD14.3150
3. Phạm Diễm Thu, Trần Thành Đạo, Lê Minh Trí, Thái Khắc Minh, Nguyễn Quốc Thái. Nghiên cứu xây dựng mô hình docking và mô phỏng động lực học phân tử các dẫn chất chalcon có tác dụng ức chế enzym monoamin oxidase B. *Tạp Chí Y Dược Học*. 2021;38:58-63.