

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGÔ TRIỀU DŨ

**XÂY DỰNG MÔ HÌNH PHÂN LOẠI VÀ DỰ ĐOÁN
CÁC CHẤT ỨC CHẾ BƠM NGƯỢC P-GLYCOPROTEIN,
NORA VÀ ỨNG DỤNG TRONG VIỆC SÀNG LỌC CÁC
CHALCON CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ BƠM NORA CỦA
STAPHYLOCOCCUS AUREUS ĐA ĐỀ KHÁNG THUỐC**

Ngành: Hóa Dược

Mã số: 62720403

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, năm 2019

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

Người hướng dẫn khoa học:
PGS. TS. THÁI KHẮC MINH
PGS. TS. TRẦN THÀNH ĐẠO

Phản biện 1:
Phản biện 2
Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường
hợp tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh
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 TP. HCM
- Thư viện Đại học Y Dược TP. HCM

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

1. Thai K. M., Ngo T. D., Tran T. D. (2013), *Molecular modelling on Staphylococcus aureus Nor-a efflux pump inhibitors*, Proceeding of The Eighth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, Ho Chi Minh City, Vietnam, ISBN 604660159-2, PO-PC-06, pp. 134-139.
2. Thai K. M., Ngo T. D., Phan T. V., Tran T. D., Nguyen N. V., Nguyen T. H., Le M. T. (2015), “Virtual Screening for Novel *Staphylococcus Aureus* NorA Efflux Pump Inhibitors From Natural Products”, *Medicinal Chemistry*, 11(2), pp. 135-155.
3. Ngo T. D., Tran T. D., Le M. T., Thai K. M. (2016), “Computational predictive models for P-glycoprotein inhibition of in-house chalcone derivatives and drug-bank compounds”, *Molecular Diversity*, 20(4), pp. 945-961.
4. Ngo T. D., Tran T. D., Le M. T., Thai K. M. (2016), “Machine learning-, rule- and pharmacophore-based classification on the inhibition of P-glycoprotein and NorA”, *SAR and QSAR in Environmental Research*, 27(9), pp. 747-780.
5. Ngô Triều Dũ, Trần Thành Đạo, Nguyễn Thị Thu Hà, Lê Minh Trí, Thái Khắc Minh (2016), “Dự đoán hoạt tính ức chế p-glycoprotein bằng các phương pháp máy học và docking”, *Y học Thành Phố Hồ Chí Minh*, 20(2), tr. 131-138.

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Đặt vấn đề và mục tiêu nghiên cứu

Đề kháng đa thuốc (MDR) là một trong những vấn đề chính thách thức việc điều trị bệnh ung thư cũng như bệnh nhiễm trùng. Các khối u và vi khuẩn tự bảo vệ mình khỏi sự tấn công của các thuốc hóa trị bằng nhiều cơ chế khác nhau, bao gồm sự đề kháng qua trung gian bơm ngược. Trong đó, P-glycoprotein của người (P-gp) và NorA của *Staphylococcus aureus* là hai mục tiêu thuốc được chọn của đề tài, do vai trò của chúng trong việc chuyên chở thuốc ra ngoài tế bào, dẫn đến sự đề kháng với các thuốc kháng ung thư và kháng sinh. Nhiều nghiên cứu đã báo cáo các chất ức chế cả P-gp và NorA như verapamil, reserpin, piperin, capsaicin, osthol, curcumin, ... Với chi phí thấp, các phương pháp thiết kế thuốc với sự trợ giúp của máy tính (CADD) vẫn là một lựa chọn phù hợp và khả thi để tiếp tục nghiên cứu, tìm kiếm các chất ức chế bơm ngược nhằm khôi phục hiệu quả của liệu pháp hóa trị ở tế bào ung thư và vi khuẩn đề kháng.

Đề tài nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xây dựng mô hình phân loại và dự đoán các chất ức chế bơm ngược P-glycoprotein, NorA và ứng dụng trong việc sàng lọc các chalcon có khả năng ức chế bơm NorA của *S. aureus* đa đề kháng thuốc. Bao gồm bốn nội dung:

1. Xây dựng các mô hình máy tính dựa trên phối tử, bao gồm:
 - Các mô hình học máy đơn lẻ và kết hợp giúp phân loại tốt chất ức chế, chất không ức chế P-gp; và dự đoán tốt hoạt tính ức chế bơm ngược này (IC_{50}).

- Các bản đồ nhận thức về sự chồng phủ phối tử giữa P-gp và NorA, qua đó xác định các tính chất lý hóa, đầu vôn tay cần thiết để ức chế ít nhất một trong hai bơm ngược.
 - Mô hình pharmacophore cho các chất ức chế P-gp mạnh trong điều trị ung thư và mô hình pharmacophore cho các chất ức chế NorA nhưng không ức chế P-gp trong điều trị nhiễm trùng.
2. Xây dựng các mô hình máy tính dựa trên cấu trúc (mô hình tương đồng của P-gp) và thực hiện docking phân tử nhằm xác định các tương tác gắn kết, cũng như ái lực gắn kết của phức hợp phối tử-protein.
 3. Sàng lọc các chất “hit” là những ứng viên ức chế P-gp, NorA mới và hiệu quả từ hai thư viện nội bộ và Ngân hàng Thuốc bằng các công cụ máy tính thu được.
 4. Đánh giá *in vitro* khả năng ức chế bơm ngược NorA của các chalcon “hit” nội bộ, qua đó làm giảm sự đề kháng với ciprofloxacin khi phối hợp trên chủng *S. aureus* SA-1199B (biểu lộ quá mức NorA) và một số chủng SA lâm sàng.

b. Tính cấp thiết của đề tài

Qua nhiều thập kỷ nghiên cứu vẫn chưa có thuốc nào sẵn có cho mục đích chặn P-gp trên lâm sàng. Mặt khác, cũng chưa có chất ức chế NorA nào được đưa vào thử nghiệm trên người. Trong các nỗ lực nghiên cứu tiếp theo, bao gồm cả các nghiên cứu trên máy tính, khung flavonoid cũng được xem xét cho hoạt tính ức chế hai loại bơm ngược này. Các kết quả khả quan thu được góp phần

định hướng cho đề tài thực hiện sàng lọc, thử nghiệm hoạt tính ức chế NorA của tập dữ liệu gần 100 chalcon nội bộ với sự đa dạng các nhóm thế.

c. Những đóng góp mới của luận án

Đề tài đã góp phần xây dựng các mô hình phân loại và dự đoán máy tính giúp giải quyết các vấn đề được nhìn nhận từ các nghiên cứu *in silico* đã được công bố trước đó, bao gồm những nghi vấn về khả năng ngoại suy (do được phát triển từ các tập dữ liệu tương đối nhỏ, không đảm bảo tính đa dạng, đồng nhất) và những hạn chế của các mô hình học máy đơn lẻ được báo cáo trong các nghiên cứu này. Ngoài đánh giá thông kê, khả năng ứng dụng của các công cụ máy tính thu được còn được kiểm chứng bằng các thử nghiệm *in vitro* trên chủng vi khuẩn chuẩn biểu lộ quá mức bơm ngược cũng như trên các chủng đề kháng phân lập từ lâm sàng. Đồng thời qua đó, các ứng viên ức chế bơm ngược tiềm năng được khám phá.

d. Bố cục luận án

Luận án gồm 117 trang: mở đầu 3 trang, tổng quan 18 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 24 trang, kết quả 53 trang, bàn luận 16 trang, kết luận và kiến nghị 3 trang. Luận án có 21 bảng, 20 hình, 220 tài liệu tham khảo gồm 1 tài liệu tiếng việt và 219 tài liệu tiếng anh, 9 phụ lục thể hiện các kết quả và thông tin.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Các bơm ngược nghiên cứu

- P-glycoprotein của người (P-gp/ABCB1/MDR1): liên họ ABC
- NorA của *S. aureus*: liên họ MFS

2.2. Các chất ức chế bơm ngược

- Các chất ức chế P-gp: thể hệ I, II, III và IV
- Các chất ức chế NorA: tự nhiên và tổng hợp
- Flavonoid, bao gồm chalcon
- Các thư viện hóa học sẵn có như Zinc, PubChem, ChemSpider, ChEMBL, NuBBE DB, ChemBank, eMolecules, DrugBank, Binding DB, ...

2.3. Đề kháng kháng sinh

- Sự phát triển đề kháng và *S. aureus* kháng thuốc nằm trong danh sách vi khuẩn đề kháng cần ưu tiên cho nghiên cứu phát triển của WHO năm 2017.
- Chiến lược đồng sử dụng kháng sinh với chất ức chế bơm

2.4. Các nghiên cứu trước có liên quan

Phần lớn các nghiên cứu được công bố là dựa vào phối tử.

- Các mô hình phân loại chất ức chế và chất không ức chế P-gp (biến nhị phân): nhiều mô hình trước đó được phát triển từ các tập dữ liệu tương đối nhỏ và hầu hết đều là các mô hình học máy đơn lẻ, rất ít mô hình kết hợp được xây dựng.
- Các mô hình dự đoán hoạt tính ức chế P-gp (biến liên tục): khả năng ứng dụng của các mô hình này vẫn còn phải bàn cãi bởi vì chúng chỉ được tạo ra từ một số lượng phân tử nghiên cứu hạn chế.

2.5. Các thuật toán học máy trong Clementine 12.0

Hạch Binary Classifier được sử dụng cho mục đích phân loại (biến nhị phân), cho phép ước tính tối đa mười mô hình học máy đơn lẻ là mạng nơron; C5.0; cây phân loại và hồi quy (C&R

Tree); cây thống kê hiệu quả, không thiên vị, nhanh (QUEST); máy dò tương tác tự động chi bình phương (CHAID); hồi quy logistic; mặt nghiêng quyết định; mạng Bayesian; phân tích phân biệt và máy vector hỗ trợ (SVM).

Hạch Numeric Predictor được sử dụng cho mục đích dự đoán (biến liên tục), cho phép ước tính tối đa sáu mô hình học máy đơn lẻ là mạng nơron; cây phân loại và hồi quy (C&R Tree); máy dò tương tác tự động chi bình phương (CHAID); hồi quy; tuyến tính suy rộng và máy vector hỗ trợ (SVM).

Hạch Ensemble được đưa vào để kết hợp các dự đoán từ những mô hình đúng nhất.

2.6. Các công cụ máy tính khác

- Bản đồ nhận thức, pharmacophore: dựa trên phối tử
- Mô hình hóa tương đồng, docking: dựa trên cấu trúc protein

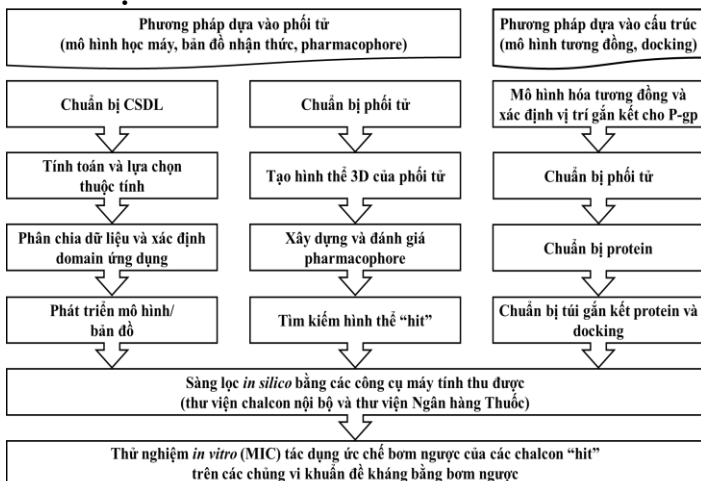
2.7. Thử nghiệm tác dụng ức chế bơm ngược trên các chủng vi khuẩn đề kháng

Sự tồn tại các chất ức chế chung của P-gp và NorA đã gợi ý cho đề tài thực hiện đánh giá tác dụng ức chế bơm ngược trên các chủng vi khuẩn đề kháng. Nguyên tắc là nếu một chất có khả năng ức chế bơm ngược, nó có thể làm giảm sự đề kháng của chủng vi khuẩn MDR do hệ thống bơm ngược biểu lộ quá mức với các kháng sinh đã bị đề kháng hoặc làm cho nó trở nên nhạy cảm với kháng sinh như chủng tự nhiên. Do đó, hiệu quả ức chế bơm ngược của chất thử nghiệm có thể được xác định thông qua thử nghiệm đánh giá khả năng làm giảm giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của kháng sinh chất nền trên các chủng vi khuẩn

đề kháng bằng cách tăng biểu lộ bơm ngược khi có sự hiện diện của chất thử nghiệm đó ở một nồng độ cụ thể nhỏ hơn MIC của chính nó (kiểm tra bằng mẫu chứng không có kháng sinh).

Trong nghiên cứu này, thử nghiệm MIC của kháng sinh được thực hiện bằng phương pháp vi pha loãng trong môi trường lỏng.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU



Hình 2.1. Quy trình nghiên cứu của đề tài

3.1. Phương pháp nghiên cứu *in silico*

- Các tập dữ liệu chứa 2156, 499 và 54 chất lần lượt được chọn để xây dựng các mô hình phân loại, dự đoán và bản đồ nhận thức.
- 4 chất ức chế P-gp mạnh và 3 chất ức chế chọn lọc NorA lần lượt được chọn để xây dựng các pharmacophore tương ứng.
- 95 chalcon nội bộ (Bộ môn Hóa Dược, Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh) và 6874 hợp chất Ngân hàng Thuốc được sử dụng cho mục đích sàng lọc.

3.2. Phương pháp nghiên cứu *in vitro*

Các thử nghiệm *in vitro* được thực hiện trên các chủng vi khuẩn:

S. aureus SA-1199

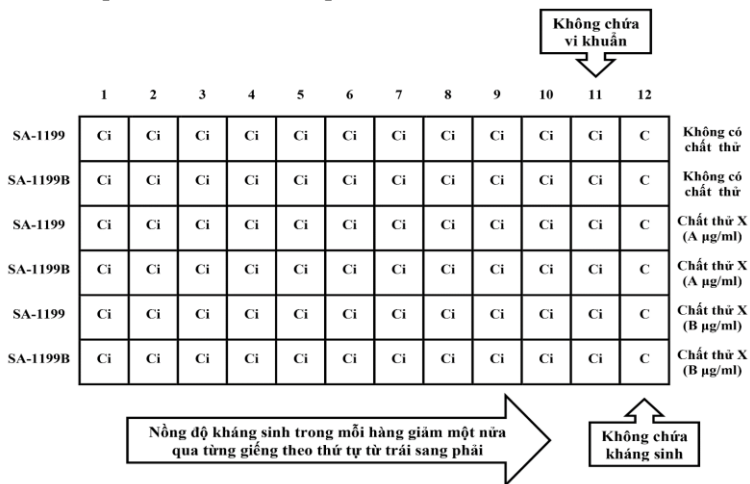
- Tự nhiên, phân lập từ máu của bệnh nhân nhiễm trùng huyết
- Nhạy cảm với ciprofloxacin

S. aureus SA-1199B

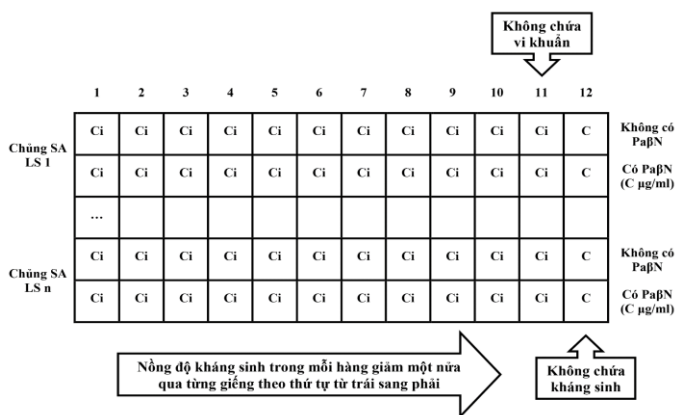
- Đột biến, phân lập từ thỏ với thử nghiệm viêm màng trong tim
- Đề kháng ciprofloxacin do biểu lộ quá mức NorA

S. aureus lâm sàng

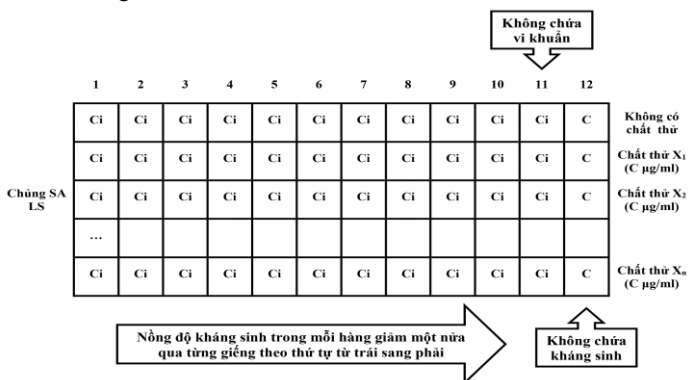
- 156 chủng
- Phân lập từ các mẫu bệnh phẩm



Hình 2.2. Xác định MIC của ciprofloxacin (Ci) trên các chủng *S. aureus* SA-1199 và SA-1199B khi vắng mặt và khi có mặt chất thử nghiệm X ở các nồng độ khác nhau (A = 50 µg/mL, B = 100 µg/mL), qua đó đánh giá khả năng ức chế bơm ngược NorA của SA của chất thử nghiệm.



Hình 2.3. Xác định MIC của ciprofloxacin (Ci) trên các chủng *S. aureus* phân lập từ lâm sàng khi vắng mặt và khi có mặt chất ức chế bơm đã biết là PaβN ở nồng độ C = 20 μg/mL, qua đó chọn lọc ra các chủng SA lâm sàng có biểu lộ quá mức bơm ngược.



Hình 2.4. Xác định MIC của ciprofloxacin (Ci) trên các chủng *S. aureus* phân lập từ lâm sàng có biểu lộ quá mức bơm ngược, khi vắng mặt và khi có mặt các chất thử nghiệm X₁, X₂, ..., X_n ở nồng độ C = 20 μg/mL, qua đó đánh giá khả năng ức chế bơm ngược của các SA lâm sàng do từng chất thử nghiệm.

4. KẾT QUẢ

4.1. Các mô hình máy tính dựa trên phôi tử

4.1.1. Các mô hình phân loại chất ức chế và chất không ức chế P-gp

Đầu tiên, các mô hình học máy đơn lẻ và kết hợp được xây dựng cho mục đích phân loại từ 24 thuộc tính (thông số mô tả, dấu vân tay) có liên quan nhất được chọn. Các kết quả thống kê từ quá trình đánh giá nội và đánh giá ngoại chặt chẽ đã chứng minh mô hình kết hợp là một mô hình mạnh, giúp khắc phục những hạn chế của các mô hình đơn lẻ và có thể ứng dụng cho các tập dữ liệu khác nhau để phân loại chất ức chế và chất không ức chế P-gp trong điều kiện chung mà không cần đi sâu lựa chọn và tối ưu các thông số của một mô hình đơn lẻ bất kỳ.

Bảng 3.1, 3.3 và 3.4. Kết quả đánh giá nội và đánh giá ngoại của mô hình phân loại kết hợp.

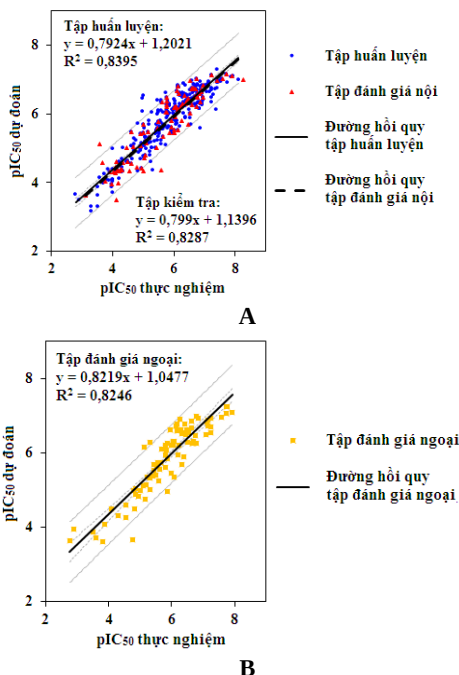
Thông số	Tập huấn luyện đa dạng	Đánh giá chéo 10 lần	Ngẫu nhiên hóa biến y 10 lần	Tập đánh giá nội	Tập đánh giá ngoại
Độ đúng	0,84	0,82	0,57	0,92	1,00
Độ nhạy	0,90	0,89	0,98	0,98	1,00
Độ đặc hiệu	0,75	0,73	0,04	0,61	1,00
Độ chính xác	0,82	0,81	0,57	0,94	1,00
MCC	0,67	0,63	0,09	0,67	1,00
G-mean	0,82	0,80	0,17	0,77	1,00
GH+	0,86	0,85	0,78	0,96	1,00
GH-	0,80	0,78	0,37	0,71	1,00

4.1.2. Các mô hình dự đoán hoạt tính ức chế P-gp

Đầu tiên, các mô hình học máy đơn lẻ và kết hợp được xây dựng cho mục đích dự đoán (IC_{50}) từ 34 thông số mô tả (PaDEL, MOE) có liên quan nhất được chọn. Các kết quả thống kê từ quá trình đánh giá nội và đánh giá ngoại chặt chẽ đã chứng minh mô hình kết hợp là một mô hình mạnh, giúp khắc phục những hạn chế của các mô hình đơn lẻ và có thể dự đoán chính xác hoạt tính ức chế P-gp cho các tập dữ liệu khác nhau trong điều kiện chung mà không cần đi sâu lựa chọn và tối ưu các thông số của một mô hình đơn lẻ bất kỳ.

Bảng 3.6, 3.7, 3.8 và 3.9. Kết quả đánh giá nội và đánh giá ngoại của mô hình dự đoán kết hợp.

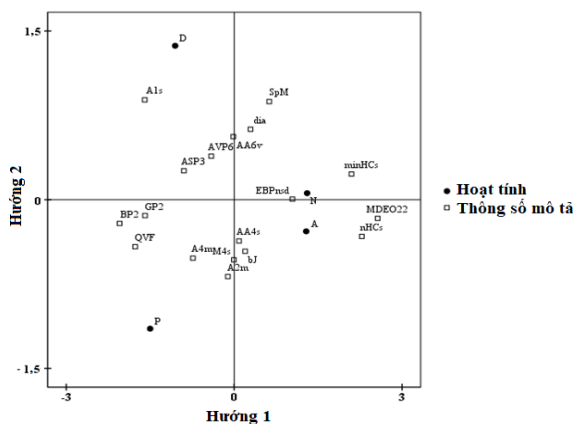
Thông số	Tập huấn luyện đa dạng	Tập đánh giá nội	Tập đánh giá ngoại
R^2	0,84	-	-
Q^2_{Loo}	0,70	-	-
$ R^2 - Q^2_{Loo} $	0,14	-	-
r_m^2	0,80	0,80	0,82
$r_m'^2$	0,64	0,64	0,67
$\overline{r_m^2}$	0,72	0,72	0,74
Δr_m^2	0,16	0,16	0,16
R_r^2	0,29	-	-
R_p^2	0,62	-	-
Q_{F1}^2	-	0,83	0,83
Q_{F2}^2	-	0,83	0,82
Q_{F3}^2	-	0,81	0,83
CCC	-	0,90	0,90
MAE	-	-	0,31
MAE+3*SD	-	-	0,96
Chất lượng dự đoán	-	-	Tốt



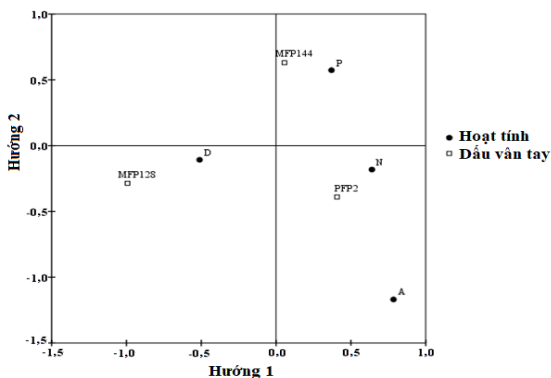
Hình 3.1. Đồ thị phân tán của mô hình kết hợp trên các tập dữ liệu: (A) Trên tập huấn luyện và tập đánh giá nội; (B) Trên tập đánh giá ngoại.

4.1.3. Bản đồ nhận thức về sự ức chế bơm ngược qua trung gian P-gp và NorA

Từ tập dữ liệu nhỏ 54 chất mà sẵn có thông tin hoạt tính trên cả hai protein P-gp và NorA, các bản đồ nhận thức được tạo ra dựa trên 21 thuộc tính (thông số mô tả, dấu vân tay) được chọn, sử dụng kỹ thuật đo lường đa hướng MDS ALSCAL trong trường hợp biến là các thông số mô tả (thang đo khoảng) và kỹ thuật phân tích tương hợp CA trong trường hợp biến là các dấu vân tay nhị phân (thang đo danh nghĩa).



Hình 3.2. Bản đồ nhận thức đo lường đa hướng (MDS) của các lớp hoạt tính và các thông số mô tả.

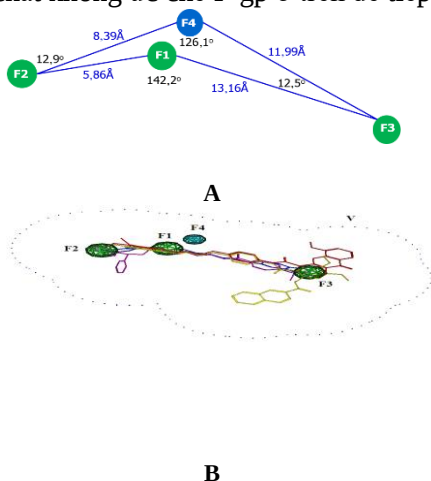


Hình 3.3. Bản đồ nhận thức phân tích tương hợp (CA) của các lớp hoạt tính và các dấu vân tay.

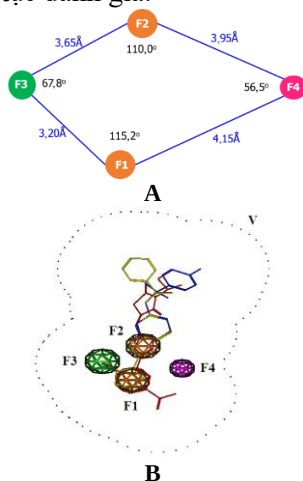
4.1.4. Các mô hình pharmacophore cho hoạt tính ức chế P-gp mạnh và cho sự ức chế chọn lọc NorA

Trong mỗi trường hợp, các truy vấn pharmacophore được tạo ra từ các chất có hoạt tính được chọn. Tiếp theo, ba truy vấn tốt nhất

được áp dụng để tìm kiếm cho tập dữ liệu 54 chất đã được sử dụng cho mục đích xây dựng bản đồ nhận thức ở trên để tìm ra truy vấn có kết quả tìm kiếm tốt nhất. Sau đó, truy vấn này được bổ sung ràng buộc thể tích để chặt chẽ hơn nhằm tăng nhận dạng chất có hoạt tính và giảm nhận dạng chất không có hoạt tính. Truy vấn thu được sau cùng được áp dụng để tìm kiếm trên hai tập dữ liệu hình thể của 1028/2134 chất và 22 chalcon mà đã được sử dụng để phát triển các mô hình phân loại chất ức chế và chất không ức chế P-gp ở trên để tiếp tục đánh giá.



Hình 3.4. Pharmacophore chất ức chế P-gp mạnh HHHaV (F1, F2, F3: Nhóm kỵ nước; F4: Nhóm nhận liên kết hydro; V: Giới hạn thể tích): (A) Các khoảng cách và góc; (B) Với các chất có hoạt tính (aripiprazol, ebastin, tariquidar và elacridar).



Hình 3.5. Pharmacophore chất ức chế NorA nhưng không ức chế P-gp RRHdV (F1, F2: Yếu tố vòng thơm/vòng Pi; F3: Nhóm kỵ nước; F4: Nhóm cho liên kết hydro; V: Giới hạn thể tích): (A) Các khoảng cách và góc; (B) Với các chất có hoạt tính (20, 21, 30).

Các kết quả đánh giá thu được giúp chứng minh mô hình pharmacophore cho hoạt tính ức chế P-gp mạnh và mô hình pharmacophore cho hoạt tính ức chế NorA nhưng không ức chế P-gp có thể được sử dụng để sàng lọc ảo nhằm tìm kiếm các chất ức chế P-gp mới và hiệu quả cũng như các chất ức chế NorA mới và an toàn.

4.2. Các mô hình máy tính dựa trên cấu trúc (mô hình tương đồng của P-gp)

Trong bốn mô hình tương đồng của P-gp được tạo ra bởi server tự động I-TASSER, mô hình 1 có chất lượng được đánh giá là tốt nhất. Trong đồ thị Ramachandran của mô hình 1, dưới 90 % acid amin được phát hiện trong các vùng lõi có thể được giải thích là do độ phân giải chưa cao của cấu trúc đĩa dùng để xây dựng mô hình tương đồng (4,35 Å). Túi gắn kết của mô hình này cũng được dự đoán bởi server cho mục đích docking.

Bảng 3.13. Bốn mô hình tương đồng tốt nhất của P-gp được dự đoán bởi I-TASSER với thông tin đĩa và các thông số ước tính.

Mô hình	Đĩa sử dụng	C-score	TM-score	RMSD	Số lượng decoy	Mật độ đám
1	3g61A	0,58	$0,79 \pm 0,09$	$8,1 \pm 4,4$ Å	1850	0,17
2	4m1mA	0,96	-	-	1200	0,24
3	4f4cA	0,38	-	-	1212	0,14
4	3g5uA	-2,11	-	-	84	0,01

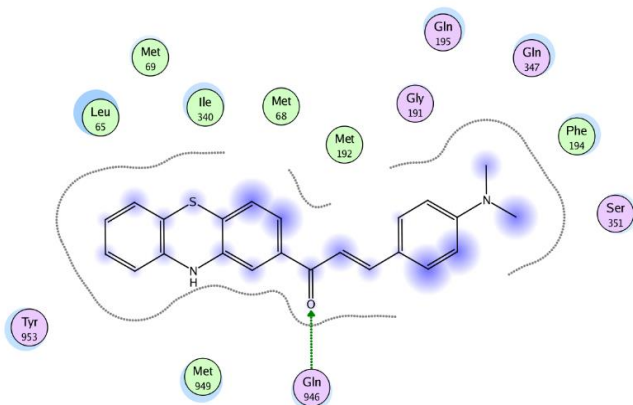
Trong quá trình phân loại chất ức chế và chất không ức chế P-gp, 10 chalcon nội bộ là F7, F33, F36, F37, F59, F60, F89, F90, F91 và F95 được 9/10 mô hình (trừ mặt nghiêng quyết định) xác định là các chất ức chế P-gp. Tất cả mười mô hình (bao gồm mặt nghiêng quyết định) cùng thống nhất dự đoán 211 hợp chất Ngân hàng Thuốc là các chất dương tính về khả năng ức chế P-gp.

Trong quá trình dự đoán hoạt tính ức chế P-gp, mô hình tốt nhất là mô hình kết hợp đã dự đoán 27 chalcon nội bộ (F4, F5, F6, F7, F11, F14, F16, F17, F18, F29, F30, F32, F33, F34, F35, F36, F37, F44, F45, F61, F63, F65, F88, F89, F90, F91, F95) và 2373 hợp chất Ngân hàng Thuốc có giá trị IC_{50} thấp hơn $15 \mu M$ (giá trị ngưỡng để được xem là chất ức chế P-gp). Trong số 47 hợp chất Ngân hàng Thuốc có giá trị pIC_{50} dự đoán ≥ 7 , amiodaron, tacrolimus, indinavir, ritonavir, cyclosporin và saquinavir là các chất ức chế P-gp đã biết, theo U.S. FDA.

Trong quá trình sàng lọc bằng pharmacophore, có 5 chalcon nội bộ là F58, F59, F89, F90, F91 và 69 hợp chất Ngân hàng Thuốc thỏa mãn mô hình pharmacophore của các chất ức chế P-gp mạnh (HHHaV); đồng thời có 4 chalcon nội bộ là F88, F89, F90, F91 và 611 hợp chất Ngân hàng Thuốc thỏa mãn mô hình pharmacophore của các chất ức chế chọn lọc NorA (RRHdV).

Trong quá trình docking, 95 chalcon nội bộ đã được dock thành công vào túi gắn kết của protein mục tiêu với điểm số docking nằm trong khoảng -23,85 đến -10,83 kJ/mol. Ba chalcon có điểm số docking thấp nhất là F57, F53 và F91. Trong số 47 hợp chất Ngân hàng Thuốc có giá trị IC_{50} dự đoán thấp nhất, 11 chất không

dock được, 7 chất có điểm số docking dương và 29 chất có điểm số docking âm (-20,06 đến -0,01 kJ/mol). Ba hợp chất Ngân hàng Thuốc có điểm số docking thấp nhất là DB04869 (olcegepant); DB01232 (saquinavir) và DB02785. Các acid amin chịu trách nhiệm chính cho các tương tác gắn kết phối tử - protein (liên kết hydro, aren-cation và kỵ nước) được xác định và túi gắn kết thuốc đặt tại mặt phân giới TM3/TM11 được tái khẳng định.



Hình 3.12. Hình ảnh docking vào mô hình tương đồng P-gp của chalcon F91.

4.4. Sàng lọc *in silico* và *in vitro* đánh giá tác dụng ức chế bơm ngược NorA trên *S. aureus* của một số chalcon nội bộ

Bốn chalcon nội bộ F29, F88, F90 và F91 (có kết quả sàng lọc *in silico* trên P-gp tốt và mẫu thử sẵn có) được chọn để thực hiện dự đoán máy tính bằng mô hình dự đoán IC₅₀ tốt nhất trên NorA (mô hình D) và mô hình tương đồng của bơm ngược này được tạo ra trong một nghiên cứu khác của chúng tôi, trước khi tiến hành thử nghiệm tác dụng ức chế bơm ngược trên vi khuẩn.

Bảng 3.16. Kết quả dự đoán hoạt tính ức chế NorA bằng mô hình D và docking vào mô hình tương đồng của protein này của các chalcon “hit”.

Chất	rings	balabanJ	logS	pIC ₅₀ dự đoán	IC ₅₀ dự đoán (μ M)	Điểm số docking (kJ/mol)	
						Khoang trung tâm	Walker B
F29	2	1,85	-3,75	4,05	88,27	-23,67	-26,69
F88	4	1,26	-6,92	5,42	3,84	-22,65	-29,06
F90	4	1,25	-6,29	5,28	5,24	-23,76	-30,33
F91	4	1,21	-6,12	5,30	5,07	-24,96	-27,78

Bảng 3.17. Giá trị MIC (μ g/mL) của ciprofloxacin trên các chủng *S. aureus* SA-1199 và SA-1199B khi vắng mặt và khi có mặt các chalcon nghiên cứu.

MIC	SA-1199	SA-1199B
Ciprofloxacin	< 0,125 μ g/mL	4 μ g/mL
Ciprofloxacin + F29 ^a	< 0,125 μ g/mL	4 μ g/mL
Ciprofloxacin + F29 ^b	< 0,125 μ g/mL	2 μ g/mL
Ciprofloxacin + F88 ^a	< 0,125 μ g/mL	2 μ g/mL
Ciprofloxacin + F88 ^b	< 0,125 μ g/mL	2 μ g/mL
Ciprofloxacin + F90 ^a	< 0,125 μ g/mL	2 μ g/mL
Ciprofloxacin + F90 ^b	< 0,125 μ g/mL	2 μ g/mL
Ciprofloxacin + F91 ^a	< 0,125 μ g/mL	4 μ g/mL
Ciprofloxacin + F91 ^b	< 0,125 μ g/mL	4 μ g/mL

^a50 μ g/mL; ^b100 μ g/mL.

Bảng 3.18. Mười chủng *S. aureus* lâm sàng được chọn bằng chất ức chế bơm Pa β N ở C = 20 μ g/mL để thử nghiệm tác dụng ức chế bơm ngược.

Chủng SA	MRSA	MIC	MIC	Tỷ số X/Y
		ciprofloxacin (μ g/mL) (X)	ciprofloxacin (μ g/mL) + Pa β N (Y)	
I16.1412	+	32	8	4
I16.1421	-	1	0,25	
I16.1461	+	64	16	
I16.1505	+	64	16	
I16.1562	+	64	16	
I16.1604	+	16	4	
I16.1617	+	32	8	
I16.1635	+	32	8	
I16.1672	+	32	8	
I16.1773	+	32	8	

Bảng 3.19. Giá trị MIC ($\mu\text{g/mL}$) của ciprofloxacin (Ci) trên các chủng *S. aureus* lâm sàng khi vắng mặt và khi có mặt các chalcon nghiên cứu ở C = 20 $\mu\text{g/mL}$.

Chủng SA	MIC Ci ($\mu\text{g/mL}$)	MIC Ci ($\mu\text{g/mL}$) + F29	MIC Ci ($\mu\text{g/mL}$) + F88	MIC Ci ($\mu\text{g/mL}$) + F90	MIC Ci ($\mu\text{g/mL}$) + F91
I16.1412	16	16	16	16	16
I16.1421	0,5	0,125	0,125	0,125	0,5
I16.1461	32	32	32	32	32
I16.1505	32	32	16	32	32
I16.1562	32	32	16	32	32
I16.1604	16	16	16	16	16
I16.1617	16	16	16	16	16
I16.1635	32	32	16	16	16
I16.1672	32	16	16	16	16
I16.1773	16	16	16	16	16

5. BÀN LUẬN

5.1. Các mô hình máy tính dựa trên phối tử

5.1.1. Các mô hình phân loại chất ức chế và chất không ức chế P-gp

Trong khi nghiên cứu này cùng với các công trình của Cruciani và cộng sự (2011), Hou và cộng sự (2011), Ecker và cộng sự (2012), (2014), Nantasenamat và cộng sự (2015), Schyman và cộng sự (2016), Worachartcheewan và cộng sự (2017), Tseng và cộng sự (2019) sử dụng các tập dữ liệu lớn với hơn 1000 - 2000 phân tử, các nghiên cứu còn lại chỉ dựa trên các tập dữ liệu tương đối nhỏ.

Hiện có rất ít mô hình kết hợp được xây dựng, như các mô hình kết hợp mạng nơron nhân tạo và SVM của Éric và cộng sự (2014), sử dụng phương pháp bầu chọn đơn giản (simple voting), áp dụng nguyên tắc số đông. Nghiên cứu này sử dụng phương pháp bầu chọn dựa trên trọng số độ tin cậy (confidence-weighted

voting), trong đó dự đoán với độ tin cậy cao hơn được chọn trong mỗi trường hợp.

Ngoài ra, vai trò của tính công kênh về mặt cấu trúc, khả năng tích điện, nguyên tử N, các nhóm nhận và cho hydro cũng được khẳng định trong việc xác định các chất ức chế P-gp thông qua nghiên cứu này.

5.1.2. Các mô hình dự đoán hoạt tính ức chế P-gp

Trước đó, nhiều nghiên cứu dự đoán pIC_{50}/pK_d sử dụng các phương pháp từ đơn giản đến phức tạp, đã thu được các kết quả thống kê tốt và giúp xác định các yếu tố cấu trúc cần thiết cho sự đảo ngược MDR qua trung gian P-gp. Tuy nhiên, khả năng ứng dụng của các mô hình nói trên vẫn còn phải bàn cãi bởi vì chúng chỉ được tạo ra từ một số lượng phân tử nghiên cứu hạn chế.

Các mô hình của nghiên cứu này được xây dựng từ tập dữ liệu đủ lớn và đa dạng, trong đó thông tin hoạt tính sinh học có thể so sánh được với nhau; đồng thời thỏa mãn các điều kiện đánh giá chặt chẽ và qua đó giúp khắc phục vấn đề về khả năng ngoại suy. Nghiên cứu này cũng nhấn mạnh các tính chất lý hóa cần thiết cho sự ức chế P-gp là diện tích bề mặt, khả năng phân cực, liên kết hydro, tính thân dầu, trọng lượng phân tử, chuỗi béo dài nhất và khả năng tích điện dương đã được đề cập trong các nghiên cứu trước đó.

5.1.3. Bản đồ nhận thức về sự ức chế bơm ngược qua trung gian P-gp và NorA

Bây giờ tác phân biệt giữa các lớp hoạt tính trên P-gp và NorA:

Quy tắc 1 để phân biệt giữa (P, D) & (A, N)

P, D: nHCSatu, minHCSatu, ETA_BetaP_ns_d, MDEO-22, MACCSFP144, Pubchem 2 trội hơn; A, N: BCUT_PEOE_2, GCUT_PEOE_2 trội hơn

Quy tắc 2 để phân biệt giữa (P, A) & (D, N)

P, A: ATSC2m trội hơn; D, N: AATSC6v trội hơn

Quy tắc 3 để phân biệt giữa P, D & (A, N)

D: kích thước lớn; A/N: kích thước trung bình; P: kích thước nhỏ

Quy tắc 4 để phân biệt giữa P & D

P: ATSC4m trội hơn; D: SpMAD_DzZ, ASP-3, AVP-6 trội hơn

Quy tắc 5 để phân biệt P & (A, D, N)

P: balabanJ, AATSC4s, MATS4s trội hơn

Quy tắc 6 để phân biệt A & (P, D, N)

A: Q_VSA_FNEG trội hơn

Quy tắc 7 để phân biệt D & (P, A, N)

D: ATSC1s, MACCSFP128 trội hơn

5.1.4. Các mô hình pharmacophore cho hoạt tính ức chế P-gp mạnh và cho sự ức chế chọn lọc NorA

Bổ sung cho các kết luận của Carosati và cộng sự (2012):

- Ức chế cả hai bơm: tính kỵ nước (nhiều hơn với P-gp) và 01 nhóm nhận liên kết H

- Ức chế chỉ NorA: các vòng thơm và 01 nhóm cho liên kết H

Chất ức chế NorA nhưng không ức chế P-gp có thể tránh được các tương tác thuốc nguy hiểm qua trung gian P-gp khi được sử dụng phối hợp trong điều trị nhiễm trùng.

5.2. Mô hình tương đồng của P-gp

Để thu được mô hình tương đồng có chất lượng cao đòi hỏi protein đã vừa phải có độ phân giải cao, vừa phải có sự giống nhau ở mức độ cao về trình tự với protein mục tiêu. Cấu trúc tia X của P-gp chuột được sử dụng trong nghiên cứu này là 3g61 có độ phân giải 4,35 Å; 87 % trình tự giống với P-gp ở người và gần 100 % acid amin giống nhau trong khoang gắn kết. Trong cấu trúc này, sự hiện diện của phối tử tham khảo (QZ59-RRR) là cần thiết để dự đoán vị trí gắn kết bởi I-TASSER và để xác định chính xác vùng không gian này cho mục đích docking trong LeadIT.

5.3. Sàng lọc *in silico*

5.3.1. Khả năng ức chế P-gp

Sự đồng thuận của các phương pháp máy tính trong việc dự đoán ba chalcon nội bộ F89, F90 và F91 là hứa hẹn nhất cho hoạt tính ức chế P-gp và có thể cả NorA, còn F88 có thể là ứng viên tiềm năng để ức chế NorA. Sự đồng thuận này cũng được ghi nhận ở 17 hợp chất Ngân hàng Thuốc cho khả năng ức chế P-gp.

5.3.2. Khả năng ức chế NorA

Cả bốn chalcon nội bộ F29, F88, F90 và F91 đều được gắn kết tốt vào khoang trung tâm và Walker B của mô hình tương đồng NorA. Nhưng chỉ ba dẫn xuất F88, F90 và F91 được mô hình D dự đoán là có khả năng ức chế NorA hiệu quả do chúng có tính tan trong nước kém hơn ($\log S < -6,0$). Theo 07 quy tắc rút ra từ 02 bản đồ nhận thức, chalcon F29 có thể thiên về sự ức chế P-gp hơn là NorA.

5.4. Thử nghiệm *in vitro*

Kết quả sàng lọc *in silico* và thử nghiệm *in vitro* đã chứng minh các chalcon F88 và F90 là các ứng viên ức chế NorA tiềm năng, giúp điều hòa MDR trong bệnh nhiễm trùng (làm giảm MIC của ciprofloxacin từ 2 - 4 lần trên các chủng *S. aureus* đề kháng là SA-1199B và một số chủng lâm sàng). Khả năng áp dụng các công cụ *in silico* cho việc dự đoán sự ức chế P-gp và NorA được khẳng định lại bằng nghiên cứu thực nghiệm, bên cạnh các đánh giá thống kê trên máy tính. Đồng thời, một số mối quan hệ cấu trúc - tác dụng (SAR) được rút ra từ 04 chalcon thử nghiệm. Các yếu tố cấu trúc này cũng được ghi nhận là liên quan đến độc tính mạnh và chọn lọc trên tế bào ung thư của các chalcon dị vòng (F88, F90) thông qua một nghiên cứu khác.

6. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu này đã thực hiện được mục tiêu đặt ra ban đầu với bốn nội dung. Cụ thể:

1. Trong phương pháp dựa vào phối tử, kết quả đạt được là: các mô hình học máy có khả năng phân loại tốt chất ức chế và chất không ức chế P-gp; các mô hình học máy có khả năng dự đoán tốt hoạt tính ức chế P-gp (IC_{50}); hai bản đồ nhận thức và bảy quy tắc về sự chồng phủ phối tử giữa P-gp và NorA; các yếu tố pharmacophore của chất ức chế P-gp mạnh và chất ức chế NorA nhưng không ức chế P-gp.
2. Trong phương pháp dựa vào cấu trúc của protein, mô hình tương đồng của P-gp được tạo ra cho docking phân tử.

3. Các chất “hit” là những ứng viên ức chế P-gp, NorA được nhận diện bằng máy tính.
4. Các chalcon “lead” (F88, F90) có khả năng ức chế bơm ngược NorA của *S. aureus* được xác định thông qua các thử nghiệm *in vitro*.

Qua đó, một số kiến nghị được rút ra cho các hướng nghiên cứu tiếp theo trên bơm ngược và các chất ức chế bơm:

- Về phương diện máy tính, có thể ứng dụng các phần mềm, thuật toán giúp khắc phục những hạn chế của các phương pháp hiện có; sử dụng cấu trúc tinh thể được phân giải của các protein màng (nếu có) để thay cho mô hình tương đồng; phát triển các tập dữ liệu sinh học lớn, đa dạng và đồng nhất.
- Nghiên cứu riêng lẻ hoặc kết hợp trên một số bơm ngược khác ở người và vi khuẩn; cũng như xem xét khả năng tương tác thuốc do hiệu quả ức chế bơm, độ an toàn và độc tính của các chất nghiên cứu.
- Đối với các chất “hit”, có thể tiến hành tổng hợp và thử nghiệm với nhiều mô hình *in vitro* và *in vivo* khác nhau. Đối với các chất “lead”, có thể nghiên cứu tối ưu hóa cấu trúc trước khi tiến hành các bước thực nghiệm sâu hơn.
- Có thể cân nhắc một số chiến lược Hóa Dược khác như phát triển các chất hướng đặc hiệu đến các tế bào đề kháng, các chất làm giảm sự biểu lộ của bơm ngược bằng cách biến đổi con đường tín hiệu trong tế bào, ... hoặc ngoài phạm vi Hóa Dược như sử dụng các kỹ thuật nano (vi hạt, polymer) giúp chuyển giao thuốc liều cao đến đúng mục tiêu điều trị.