

NGHIÊN CỨU TIỀM NĂNG ỨC CHẾ ACETYLCHOLINESTERASE CỦA CÁC DẪN XUẤT TRANILAST BẰNG PHƯƠNG PHÁP *in vitro* và *in silico*

NGUYỄN ĐỨC TRI THỨC^{1*} - VŨ AN BÌNH¹ - HUỖNH PHÚC THƯ¹

¹Khoa Dược, Trường Đại học Tôn Đức Thắng

Faculty of Pharmacy, Ton Duc Thang University

* Email: nguyenductrithuc@tdtu.edu.vn

Ngày nhận bài: 12/5/2026

Ngày sửa bài: 26/5/2026

Ngày duyệt đăng bài: 11/6/2026

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tiềm năng ức chế acetylcholinesterase (AChE) của các dẫn xuất tranilast bằng các phương pháp *in vitro* và *in silico*. 9 dẫn xuất tranilast (5a-i) được khảo sát hoạt tính ức chế AChE bằng phương pháp Ellman và xác định giá trị IC_{50} đối với các hợp chất có hoạt tính đáng kể. Nghiên cứu docking phân tử được thực hiện trên enzym AChE (PDB ID: 4EY7) bằng phần mềm AutoDock Vina nhằm đánh giá ái lực liên kết và các tương tác ligand-enzyme. Kết quả cho thấy, 4 dẫn xuất 5f, 5g, 5h và 5i có hoạt tính ức chế AChE đáng chú ý với giá trị IC_{50} lần lượt là $45,51 \pm 5,05$; $40,96 \pm 2,58$; $21,64 \pm 1,03$ và $44,17 \pm 2,45 \mu M$. Trong đó, hợp chất 5h mang nhóm thế 4,5-dimethoxy thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Kết quả docking cho thấy, các dẫn xuất có năng lượng liên kết từ -9,3 đến -11,2 kcal/mol; riêng 5h đạt ái lực liên kết tốt nhất (-11,2 kcal/mol) và hình thành nhiều tương tác quan trọng với các amino acid thuộc vùng CAS và PAS của AChE. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dẫn xuất tranilast, đặc biệt là hợp chất 5h, có tiềm năng phát triển thành các chất ức chế AChE. Các nhóm thế cho điện tử, nhất là nhóm methoxy, góp phần tăng cường khả năng tương tác với enzym đích và cải thiện hoạt tính sinh học.

Từ khóa: bệnh Alzheimer, acetylcholinesterase, dẫn xuất tranilast, docking, phương pháp *in vitro*, phương pháp *in silico*.

Evaluation of the acetylcholinesterase inhibitory potential of tranilast derivatives using *in vitro* and *in silico* approaches

Abstract:

This study was conducted to evaluate the acetylcholinesterase (AChE) inhibitory potential of tranilast derivatives using both *in vitro* and *in silico* approaches. Nine tranilast derivatives (5a-i) were screened for AChE inhibitory activity using the Ellman assay, and IC_{50} values were determined for compounds exhibiting significant activity. Molecular docking studies were performed on AChE (PDB ID: 4EY7) using AutoDock Vina to assess binding affinity and ligand-enzyme interactions. The results showed that four derivatives, namely 5f, 5g, 5h, and 5i, exhibited notable AChE inhibitory activity, with IC_{50} values of 45.51 ± 5.05 , 40.96 ± 2.58 , 21.64 ± 1.03 , and $44.17 \pm 2.45 \mu M$, respectively. Among them, compound 5h bearing a 4,5-dimethoxy substituent demonstrated the most potent activity. Molecular docking analysis revealed binding energies ranging from -9.3 to -11.2 kcal/mol. Notably, compound 5h exhibited the best binding affinity (-11.2 kcal/mol) and formed multiple key interactions with amino acid residues located in both the catalytic active site (CAS) and peripheral anionic site (PAS) of AChE. The findings indicate that tranilast derivatives, particularly compound 5h, possess promising potential as AChE inhibitors. Electron-donating substituents, especially methoxy groups, appear to enhance interactions with the target enzyme and contribute to improved biological activity.

Keywords: Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, tranilast derivatives, docking.

1. Đặt vấn đề

Bệnh Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) là nguyên nhân phổ biến nhất gây sa sút trí tuệ ở người cao tuổi, đặc trưng bởi sự suy giảm tiến triển về trí nhớ và chức năng nhận thức. Mặc dù cơ chế bệnh sinh của AD liên quan đến nhiều yếu tố như sự tích tụ amyloid- β , tăng phosphoryl hóa protein tau, stress oxy hóa và viêm thần kinh, giả thuyết cholinergic vẫn được xem là một trong những cơ sở quan trọng nhất trong điều trị triệu chứng của bệnh (Zheng & Wang, 2025). Theo giả thuyết này, sự suy giảm acetylcholine (ACh) trong não dẫn đến rối loạn dẫn truyền thần kinh và suy giảm nhận thức. Acetylcholinesterase (AChE) là enzyme chịu trách nhiệm thủy phân ACh; do đó, ức chế AChE giúp làm tăng nồng độ ACh và cải thiện chức năng nhận thức. Hiện nay, các thuốc ức chế AChE như donepezil, galantamine và rivastigmine vẫn được sử dụng rộng rãi trong điều trị AD, tuy nhiên hiệu quả còn hạn chế và có thể gây tác dụng không mong muốn (Begines et al., 2026).

Tranilast là một dẫn chất của acid anthranilic đã được sử dụng trong lâm sàng như một thuốc chống dị ứng và chống viêm (Darakhshan & Pour, 2015; Saeedi-Boroujeni et al., 2021). Ngoài ra, tranilast và các dẫn xuất còn được ghi nhận có nhiều hoạt tính sinh học khác như chống oxy hóa, chống xơ hóa và chống ung thư (Ismail et al., 2020). Trong các nghiên cứu trước đây, nhóm tác giả đã tổng hợp thành công một loạt dẫn xuất tranilast và đánh giá hoạt tính kháng ung thư (Nguyen et al., 2025; Phan et al., 2024). Tuy nhiên, tiềm năng ức chế AChE của các hợp chất này vẫn chưa được khảo sát một cách hệ thống.

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hoạt tính ức chế AChE của 9 dẫn xuất tranilast bằng phương pháp Ellman kết hợp với docking phân tử, qua đó làm rõ mối liên quan giữa cấu trúc hóa học và khả năng tương tác với enzyme AChE, đồng thời định hướng phát triển các chất ức chế AChE tiềm năng trong điều trị bệnh Alzheimer (Ellman et al., 1961).

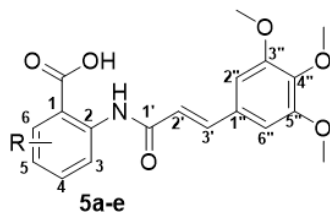
2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Hóa chất và thiết bị

2.1.1. Hóa chất

9 dẫn xuất Tranilast đã được tổng hợp trong nghiên cứu trước đây của tác giả Nguyen et al. (2025). (Hình 1)

Hình 1. Công thức cấu tạo của 9 dẫn xuất tranilast trong nghiên cứu



5a: R = 4-F	5d: R = 5-Br	5g: R = 5-OH
5b: R = 4-Cl	5e: R = 5-F	5h: R = 4,5-(OCH ₃) ₂
5c: R = 4-NO ₂	5f: R = 5-CH ₃	5i: R = 3,5-(CH ₃) ₂

Hóa chất thử hoạt tính *in vitro* bao gồm: Acetylcholinesterase (AChE), acetylthiocholine iodid (ATCI), 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), DMSO (Sigma).

2.1.2. Thiết bị

Các thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu *in vitro* bao gồm: Đĩa 96 giếng nhựa (Corning, USA), micropipette (eppendorf), máy đọc ELISA 96 giếng (Biotek)

Thiết bị được sử dụng trong nghiên cứu *in silico* là Máy tính HP Z4 G4 với cấu hình: CPU (Intel(R) Core(TM) i7-7800X CPU xung 3,50GHz), RAM 32,0 GB, card đồ họa (NVIDIA GeForce GTX 1080 - 8 GB) với hệ điều hành Windows 11 Pro.

2.2. Phương pháp nghiên cứu ức chế AChE *in vitro*

Hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE) được xác định bằng phương pháp đo màu Ellman với một số điều chỉnh phù hợp (Ellman et al., 1961). Nguyên tắc của phương pháp dựa trên phản ứng thủy phân cơ chất acetylthiocholine iodide (ATCI) dưới tác dụng của AChE, tạo thành thiocholine. Hợp chất này tiếp tục phản ứng với thuốc thử 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sinh ra anion 5-thio-2-nitrobenzoate có màu vàng và được đo quang ở bước sóng 405 nm. Trong thí nghiệm, dung dịch mẫu thử với các nồng độ được ủ với dung dịch enzyme AChE trong một khoảng thời gian xác định trước khi bổ sung DTNB và cơ chất ATCI để khởi động phản ứng. Sự thay đổi độ hấp thụ quang được theo dõi bằng máy đọc vi đĩa. Khả năng ức chế AChE của mẫu được đánh giá thông qua mức độ giảm tốc độ hình thành sản phẩm màu so với mẫu đối chứng không chứa chất thử. Phần trăm ức chế được tính toán dựa trên sự chênh lệch giá trị hấp thụ giữa mẫu thử và đối chứng, từ đó xác định hiệu quả ức chế enzyme (IC_{50}) của các mẫu nghiên cứu.

2.3. Phương pháp nghiên cứu *in silico*

Nghiên cứu docking phân tử được thực hiện trên enzyme acetylcholinesterase (AChE, PDB ID: 4EY7) nhằm đánh giá khả năng tương tác của các hợp chất khảo sát. Cấu trúc protein được xử lý bằng cách loại bỏ phân tử nước, ligand đồng kết tinh và bổ sung nguyên tử hydro (Cheng et al., 2012). Các ligand được tối ưu hóa năng lượng và chuyển sang định dạng PDBQT trước khi docking. Quá trình docking được thực hiện bằng AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010), với hộp lưới bao phủ vùng hoạt động của enzyme. Năng lượng liên kết và các tư thế gắn kết được phân tích bằng BIOVIA Discovery Studio Visualizer để xác định các tương tác quan trọng và lựa chọn cấu dạng tối ưu cho việc thảo luận.

3. Kết quả và thảo luận

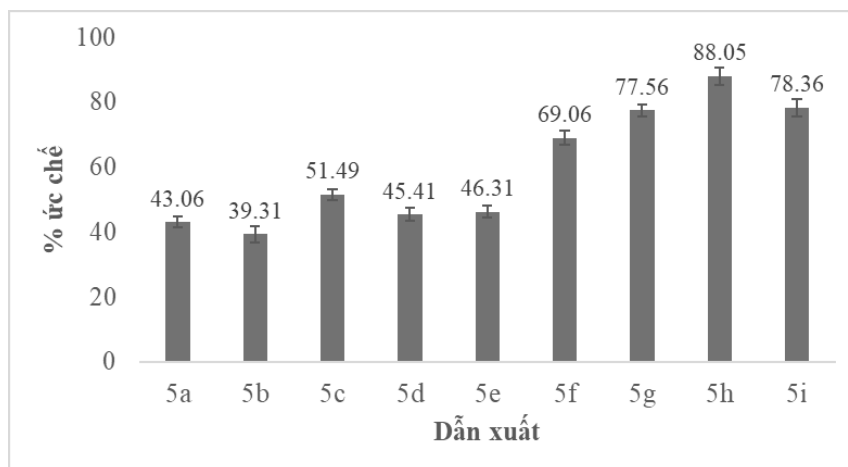
3.1. Kết quả thử nghiệm *in vitro*

9 dẫn xuất tranilast (**5a-i**) được đánh giá hoạt tính ức chế AChE theo phương pháp được mô tả trong mục 2.2. Hoạt tính ức chế *in vitro* AChE được trình bày trong Bảng 1 và Hình 2.

Bảng 1. Kết quả IC_{50} của các dẫn xuất tranilast 5a-i

Dẫn xuất	IC_{50} (μM)	Dẫn xuất	IC_{50} (μM)
5a	>100	5f	45,51 $\pm$ 5,05
5b	>100	5g	40,96 $\pm$ 2,58
5c	95,29 $\pm$ 3,75	5h	21,64 $\pm$ 1,03
5d	>100	5i	44,17 $\pm$ 2,45
5e	>100	Galantamin	1,83 $\pm$ 0,12

Hình 2. Tỷ lệ % ức chế AChE của các dẫn xuất tranilast 5a-i ở nồng độ 100 μM



3.2. Kết quả thử nghiệm in silico

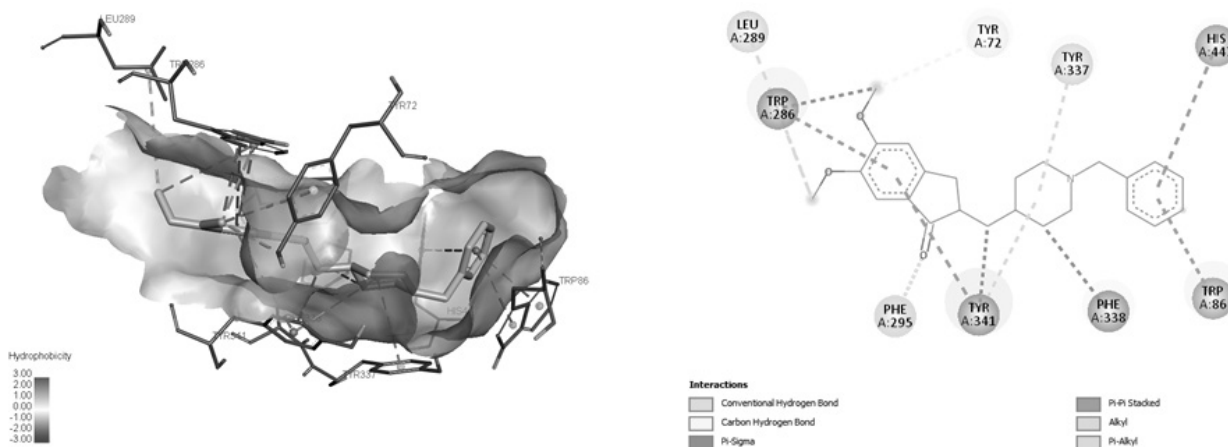
Kết quả docking phân tử vào enzyme Acetylcholinesterase (PDB ID: 4EY7) được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả docking phân tử vào receptor 4EY7

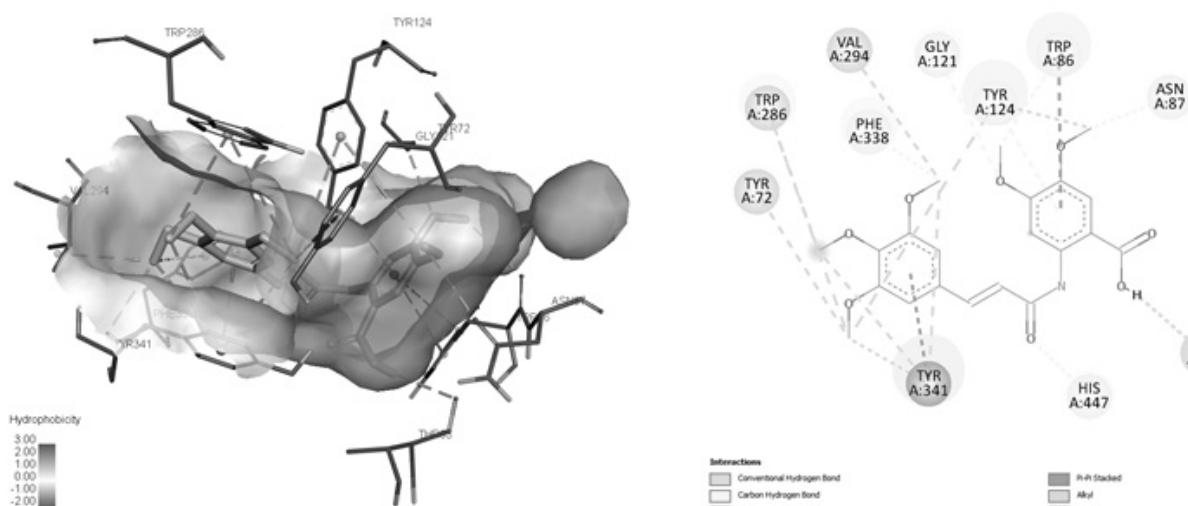
Ligand	Ái lực liên kết (kcal/mol)	Các amino acid có tương tác với ligand
Donepezil*	-12,3	Liên kết hydrogen: PHE295, TYR72; Tương tác kỵ nước: TRP286, LEU289, TYR341, PHE338, TYR337, HIS447, TRP86.
5a	-9,5	Liên kết hydrogen: ARG296, TYR124; Tương tác halogen: ASP74, THR83; Tương tác kỵ nước: TYR341, VAL294, TRP286, TYR72.
5b	-9,3	Liên kết hydrogen: TYR124, ARG296; Tương tác kỵ nước: TRP286, TYR341, TYR72, TRP86, VAL294.
5c	-9,5	Liên kết hydrogen: GLY121, GLY122, SER203, TYR124, ARG296; Tương tác bất lợi: HIS447; Tương tác kỵ nước: TRP286, TYR341, TYR72.
5d	-9,4	Liên kết hydrogen: THR83, TYR124, HIS447, PHE38; Tương tác kỵ nước: TYR341, TRP86, VAL294, TRP286, TYR72.
5e	-9,7	Liên kết hydrogen: TYR341, ASP74, TYR337, TRP86; Tương tác halogen: PHE338; Tương tác kỵ nước: TRP286, VAL294.
5f	-9,9	Liên kết hydrogen: ARG296; Tương tác kỵ nước: TRP286, TYR341, TYR72, TYR124, TRP86.
5g	-10,4	Liên kết hydrogen: TYR341, TYR337, PHE338, TYR124; Tương tác kỵ nước: TRP86, VAL294, TRP286, TYR72.
5h	-11,2	Liên kết hydrogen: THR83, HIS447, ASN87, TRP85, TYR124, GLY121, PHE38; Tương tác kỵ nước: VAL294, TRP286, TYR72, TYR341.
5i	-10,7	Liên kết hydrogen: ARG296, TYR124; Tương tác kỵ nước: TRP286, TRP86, TYR341, TYR337, HIS447.

*RMSD = 0,947 (28 atoms)

Hình 3. Tương tác giữa Donepezil và receptor 4EY7



Hình 4. Tương tác giữa 5h và receptor 4EY7



3.3. Phân tích liên quan cấu trúc và hoạt tính

Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy, hoạt tính ức chế AChE của các dẫn xuất tranilast phụ thuộc đáng kể vào bản chất và vị trí của nhóm thế trên vòng anthranilic acid. Trong số 9 dẫn xuất khảo sát, hợp chất **5h** mang nhóm 4,5-dimethoxy thể hiện hoạt tính mạnh nhất với $IC_{50} = 21,64 \pm 1,03 \mu M$, tiếp theo là các dẫn xuất **5g** (5-OH), **5i** [3,5-(CH₃)₂] và **5f** (5-CH₃) với IC_{50} lần lượt là $40,96 \pm 2,58$; $44,17 \pm 2,45$ và $45,51 \pm 5,05 \mu M$. Ngược lại, các dẫn xuất mang nhóm hút điện tử mạnh như 4-F (**5a**), 4-Cl (**5b**), 5-Br (**5d**) và 5-F (**5e**) cho hoạt tính yếu hơn đáng kể ($IC_{50} > 100 \mu M$), trong khi dẫn xuất 4-NO₂ (**5c**) chỉ đạt hoạt tính trung bình ($IC_{50} = 95,29 \pm 3,75 \mu M$). Xu hướng này cho thấy các nhóm thế cho điện tử (electron-donating groups, EDGs) trên vòng thơm có vai trò thuận lợi đối với khả năng ức chế AChE. Đặc biệt, sự hiện diện của hai nhóm methoxy trong cấu trúc **5h** có thể làm tăng mật độ electron của hệ π liên hợp, đồng thời cải thiện tính thân lipid của phân tử, từ đó tăng cường khả năng tương tác với vùng hốc thơm giàu amino acid thơm của AChE.

Kết quả docking cho thấy **5h** có ái lực liên kết cao nhất trong dãy nghiên cứu ($-11,2$ kcal/mol), gần tiệm cận với donepezil ($-12,3$ kcal/mol), đồng thời hình thành nhiều liên kết hydro với các amino acid quan trọng như THR83, TYR124, GLY121 và HIS447 (Cheng et al., 2012). TYR124 và HIS447 lần lượt thuộc vùng peripheral anionic site (PAS) và catalytic active site (CAS) của AChE. Việc hợp chất **5h** tương tác đồng thời với cả hai vùng này cho thấy khả năng gắn kết kép (dual-site binding), tương tự các chất ức chế AChE thế hệ mới. Bên cạnh đó, các tương tác kỵ nước với TRP286, TYR341 và TYR72 góp phần ổn định phức hợp ligand-enzyme và tăng cường hoạt tính sinh học.

Các dẫn xuất khác mang nhóm thế cho điện tử tại vị trí C-5 như **5f** (5-CH₃) và **5g** (5-OH) cho hoạt tính cao hơn các dẫn xuất halogen tương ứng. Đặc biệt, nhóm hydroxyl của **5g** hình thành nhiều liên kết hydro với TYR341, TYR337, PHE338 và TYR124, góp phần làm tăng ái lực liên kết ($-10,4$ kcal/mol) và hoạt tính *in vitro*. Ngược lại, các dẫn xuất halogen (**5a**, **5b**, **5d** và **5e**) thể hiện hoạt tính thấp hơn, cho thấy các tương tác halogen hoặc kỵ nước đơn thuần chưa đủ để tạo ra hiệu quả ức chế mạnh. Đối với hợp chất **5c**, mặc dù hình thành nhiều liên kết hydro với GLY121, GLY122, SER203, TYR124 và ARG296, hoạt tính chỉ ở mức trung bình. Điều này có thể liên quan đến tương tác bất lợi với HIS447 và tính hút điện tử mạnh của nhóm nitro, làm giảm độ ổn định của phức hợp ligand-enzyme.

Trong số các hợp chất khảo sát, dẫn xuất **5h** mang nhóm 4,5-dimethoxy là cấu trúc tối ưu nhất, vừa đạt hoạt tính *in vitro* cao nhất vừa thể hiện khả năng tương tác đồng thời với các amino acid thuộc cả PAS và CAS của AChE. Kết quả này gợi ý rằng việc tiếp tục thiết kế các dẫn xuất tranilast chứa nhiều nhóm alkoxy hoặc hydroxy trên nhân thơm có thể là hướng phát triển tiềm năng nhằm nâng cao hoạt tính ức chế AChE trong tương lai.

4. Kết luận

9 dẫn xuất tranilast (**5a-i**) đã được đánh giá hoạt tính ức chế acetylcholinesterase (AChE) bằng các phương pháp *in vitro* và *in silico*. Kết quả cho thấy bốn hợp chất **5f**, **5g**, **5h** và **5i** có hoạt tính đáng chú ý, trong đó dẫn xuất **5h** mang nhóm 4,5-dimethoxy thể hiện hoạt tính mạnh nhất với $IC_{50} = 21,64 \pm 1,03 \mu M$. Kết quả docking phân tử trên AChE (PDB ID: 4EY7) cho thấy, các hợp chất khảo sát có năng lượng liên kết từ -9,3 đến -11,2 kcal/mol. Đặc biệt, hợp chất **5h** có ái lực liên kết tốt nhất (-11,2 kcal/mol) và tương tác với nhiều amino acid quan trọng thuộc cả vùng CAS và PAS của enzym. Kết quả docking phù hợp với dữ liệu thực nghiệm và góp phần giải thích hoạt tính ức chế AChE nổi bật của hợp chất này.

Phân tích mối liên quan cấu trúc - hoạt tính cho thấy các nhóm thế đẩy điện tử, đặc biệt là methoxy và hydroxyl, có xu hướng làm tăng hoạt tính ức chế AChE. Nhìn chung, dẫn xuất **5h** là ứng viên tiềm năng cho định hướng phát triển các chất ức chế AChE mới, đồng thời cần được tiếp tục nghiên cứu về khả năng vượt hàng rào máu não, động lực học phân tử và đánh giá hiệu quả trên các mô hình sinh học phù hợp ■

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

- Begines, P., Fernández-Bolaños, J. G., & López, Ó. (2026). An updated patent review of acetylcholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease (2021-present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 36(2), 159-190. <https://doi.org/10.1080/13543776.2025.2602702>
- Cheung, J., Rudolph, M. J., Burshteyn, F., Cassidy, M. S., Gary, E. N., Love, J., ... & Height, J. J. (2012). Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(22), 10282-10286. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>
- Darakhshan, S., & Pour, A. B. (2015). Tranilast: A review of its therapeutic applications. *Pharmacological Research*, 91, 15-28. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.10.009>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Ismail, M. M., El-Zahabi, H. S., Ibrahim, R. S., & Mehany, A. B. (2020). Design and synthesis of novel tranilast analogs: Docking, antiproliferative evaluation and in silico screening of TGFβR1 inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, 105, 104368. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104368>
- Nguyen, D. T. T., Phan, C. L., Dao, N. N. L., Phan, T. P. T., Phan, H. D. H., & Pham, N. T. A. (2025). Synthesis and anticancer activity evaluation of N-(3,4,5-trimethoxycinnamoyl) anthranilic acid derivatives. *Letters in Organic Chemistry*, 22(7), 580-590. <https://doi.org/10.2174/0115701786355190241214054126>
- Phan, P. T. T., Pham, T. A. N., Nguyen, N. P., Nguyen, V. A. T., & Nguyen, T. H. (2024). Synthesis, bioactivity evaluation, and molecular docking study of tranilast analogs as anticancer agents. *Letters in Organic Chemistry*, 21(3), 271-278. <https://doi.org/10.2174/0115701786268073230926160649>
- Saeedi-Boroujeni, A., Mahmoudian-Sani, M. R., Nashibi, R., Houshmandfar, S., Tahmaseby Gandomkari, S., & Khodadadi, A. (2021). Tranilast: A potential anti-inflammatory and NLRP3 inflammasome inhibitor drug for COVID-19. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 43(3), 247-258. <https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1925293>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Zheng, Q., & Wang, X. (2025). Alzheimer's disease: Insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy. *Protein & Cell*, 16(2), 83-120. <https://doi.org/10.1093/procel/pwae026>