

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ CỦA MỘT SỐ HỢP CHẤT LÀ SẢN PHẨM CỦA PHẢN ỨNG CLICK GIỮA (N-PROPARGYL)ISATIN THỂ VÀ 2,3,4,6-TETRA-O-ACETYL- β -D- GLUCOPYRANOSYL AZIDE

Đến tòa soạn 26-07-2024

Nguyễn Minh Trí^{1*}, Vũ Ngọc Toán¹, Nguyễn Đình Thành²

¹Viện Công nghệ mới, Viện Khoa học và Công nghệ quân sự (Bộ Quốc phòng)

²Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên (Đại học Quốc gia Hà Nội)

*Email: nguyenminhtri.hkt@gmail.com

SUMMARY

EVALUATION OF THE CYTOTOXIC ACTIVITY OF SOME COMPOUNDS FROM CLICK REACTION BETWEEN SUBSTITUTED (N-PROPARGYL)ISATINS AND 2,3,4,6- TETRA-O-ACETYL- β -D-GLUCOPYRANOSYL AZIDE

Some 1,2,3-triazole compounds were synthesized by click reaction between substituted (N-propargyl)isatins and 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide using CuI catalyst in *t*-BuOH as solvent. The *in vitro* cytotoxic activity of some 1,2,3-triazole-isatin hybrid compounds was evaluated against two cell lines of KB carcinoma (CCL-17TM) and HepG2 (HB-8065TM). The results showed that, 05 compounds capable to inhibit KB and HepG2 cancer cell lines with IC₅₀ values = 83.20 - 91.84 and 29.5 - 86.86, respectively.

Keywords: Triazole; isatin; click chemistry; cytotoxic activity.

1. MỞ ĐẦU

Isatin (1*H*-Indole-2,3-dione) là một hợp chất thuộc nhóm indole đã được phát hiện trong mô cơ thể của một số loài sinh vật trong tự nhiên [1]. Isatin và các dẫn xuất của nó là một trong rất nhiều kiểu hợp chất được nghiên cứu một cách cụ thể về mặt hóa học cũng như các tác dụng dược lý [2]. Isatin và các dẫn xuất của nó có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng, như hoạt tính kháng ung thư [3-5], kháng khuẩn [6], kháng nấm [7], chống co giật [8], chống lao [9], kháng HIV [10], chống oxy hóa [11, 12], chống viêm [13, 14], gây tê [14], chống trầm cảm [15],...

Các azide chứa hợp phần hữu cơ có vai trò quan trọng trong tổng hợp và nghiên

cứu, cùng với đó là việc chuyển hóa các hợp chất này rất thuận tiện và dễ dàng [16]. Ngoài ra, các azide chứa hợp phần hữu cơ có thể dễ dàng chuyển hóa thành các amine, isocyanate và nhiều kiểu hợp chất khác thông qua phản ứng click.

Dị vòng 1,2,3-triazole là khung quan trọng trong phát triển thuốc với nhiều hoạt tính đã được báo cáo, đặc biệt là hoạt tính chống nấm, vi khuẩn, HIV, lao và chống viêm. Các nghiên cứu gần đây về tác dụng dược lý của nó trở nên hấp dẫn và hứa hẹn hơn nhiều trong việc thiết kế các tác nhân chống ung thư. Hơn nữa, hợp phần monosaccharide và isatin cũng là những nhóm chất chống ung thư quan trọng đối với nhiều loại ung thư khác

n nhau. Mục đích của chúng tôi nhằm tổng hợp nên các hợp chất chứa đồng thời dị vòng 1,2,3-triazole và isatin để nghiên cứu khả năng tăng cường hoạt tính của chúng lên các tác nhân chống ung thư [17, 18].

Một số dị vòng 1,2,3-triazole đã được chúng tôi tổng hợp bằng phản ứng click giữa (*N*-propargyl)isatin thể và 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide sử dụng xúc tác CuI trong dung môi *t*-BuOH [19]. Bài báo này trình bày kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư KB và HepG2 của dãy hợp chất 1,2,3-triazole tổng hợp được. Hoạt tính gây độc tế bào được thực hiện dựa trên phương pháp MTT, là một phương pháp được nhiều nhà khoa học trên thế giới sử dụng để đánh giá hoạt tính gây độc đối với một số dòng tế bào ung thư phổ biến như ung thư biểu mô KB (CCL - 17 TM), ung thư gan Hep G2 (HB - 8065 TM), ung thư phổi LU-1 (HTB - 57 TM), ung thư vú MCF-7 (HTB - 22 TM) và ung thư da SK-Mel 2 (HTB - 68 TM).

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất, thiết bị và dụng cụ

2.1.1. Hóa chất

Các hóa chất được sử dụng bao gồm: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (Sigma); dimethyl sulfoxide (99,9%, Sigma); Fetal bovine serum (FBS, Sigma); ellipticine (Sigma); dòng tế bào ung thư biểu mô KB (CCL-17TM) và ung thư gan HepG2 (HB-8065TM) (Bảo tàng giống chuẩn Hoa kỳ (ATCC)).

2.1.2. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị sử dụng bao gồm: Cân phân tích (Ohaus, Mỹ), máy đọc Elisa Biotek (Mỹ); Micropipet 100-1000 μ L; đĩa xét nghiệm miễn dịch 96 giếng và tủ môi trường.

2.2. Phương pháp thực nghiệm

2.2.1. Phương pháp tổng hợp một số hợp chất 1,2,3-triazole

Một số dị vòng 1,2,3-triazole được tổng hợp bằng phản ứng click giữa *N*-(propargyl)isatin thể với hợp phần 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl azide, sử dụng chất xúc tác CuI, dung môi *t*-BuOH bằng phương pháp đun cách thủy ở nhiệt độ 80 °C trong 6 giờ. Dữ liệu vật lý của các hợp chất thu được và dữ liệu phổ đã được trình bày cụ thể trong tài liệu tham khảo [19].

2.2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào in vitro

a. Nguyên tắc của phương pháp

Thử nghiệm MTT là một phương pháp nhạy, có độ tin cậy cao để nghiên cứu hoạt tính của tế bào và được sử dụng rộng rãi hơn so với các phương pháp khác [20]. Thử nghiệm dựa trên sự khử MTT, là một thuốc nhuộm tetrazolium màu vàng hoà tan tốt trong nước, chủ yếu bởi các dehydrogenase ty thể thành các tinh thể formazan có màu tím. Sản phẩm formazan được phân tích bằng phương pháp quang phổ (540 nm) sau khi hòa tan trong DMSO, quang phổ của các tế bào được xử lý và đưa ra ước tính về mức độ gây độc tính tế bào.

b. Chuẩn bị thí nghiệm

Hai dòng tế bào ung thư biểu mô KB (CCL-17TM), ung thư gan HepG2 (HB-8065TM) được lưu giữ trong môi trường nơơ lỏng, sau đó được nuôi trong RPMI 1640 có thêm 2-mercaptoethanol 50 μ M và FBS (Fetal Bovine Serum) nồng độ 7-10% trong 5% CO₂, độ ẩm 98%, nhiệt độ 37 °C, vô trùng.

MTT được hoà tan hoàn toàn trong đệm PBS ở nồng độ 5 mg/mL và được lọc để loại bỏ một lượng nhỏ cặn không hoà tan. Dung dịch MTT gốc được thêm vào tất cả các giếng và được ủ ở nhiệt độ 37 °C/4 giờ. Acid-isopropanol được thêm vào các

giếng và trộn kỹ để hoà tan hoàn toàn các tinh thể màu xanh đậm.

Mẫu nghiên cứu được hòa tan trong DMSO với nồng độ ban đầu là 20 mg/mL. Pha loãng mẫu ban đầu trên đĩa 96 giếng để đạt được dãy dung dịch có nồng độ lần lượt là 2560, 640, 160, 40, 10 µg/mL. Nồng độ của mẫu chất phân tích trong các đĩa thử nghiệm tương ứng là 128, 32, 8, 2, 0,5 µg/mL. Chất đối chứng cũng được hòa tan hoàn toàn trong dung môi DMSO 0,01 mM.

c. Tiến hành thí nghiệm

Chuẩn bị 2 dòng tế bào trong môi trường sạch với mật độ khoảng $1-3 \times 10^4$ tế bào/mL. Tiến hành Trypsin hóa tế bào, sau đó lấy vào mỗi giếng 10 µL chất thử đã có ở mục b và 190 µL dung dịch tế bào. Mẫu tham chiếu là môi trường chứa tế bào, đối chứng âm chỉ có môi trường nuôi cấy mà không có chứa tế bào thử nghiệm. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37 °C. Sau 72 giờ mỗi giếng tương ứng được tiếp tục ủ với 10 µL MTT nồng độ 5 mg/mL trong thời gian 4 giờ. Sau khi loại bỏ môi trường, tinh thể màu xanh đậm được hòa tan hoàn toàn trong 100 µL DMSO.

Giá trị OD của mẫu được xác định trên thiết bị quang phổ Elisa Biotek ở bước sóng 540 nm. Đo 3 lần, lấy giá trị trung bình.

d. Đánh giá kết quả thử nghiệm

Giá trị IC₅₀ là nồng độ chất thử ức chế 50% hoạt động của tế bào thử nghiệm được sử dụng để đánh giá kết quả nghiên cứu trên. Công thức xác định giá trị IC₅₀ như sau:

$$\% \text{ ức chế tế bào} = \frac{(OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{mẫu thử}})}{(OD_{\text{chứng (+)}} - OD_{\text{chứng (-)}}) \times 100\%}$$

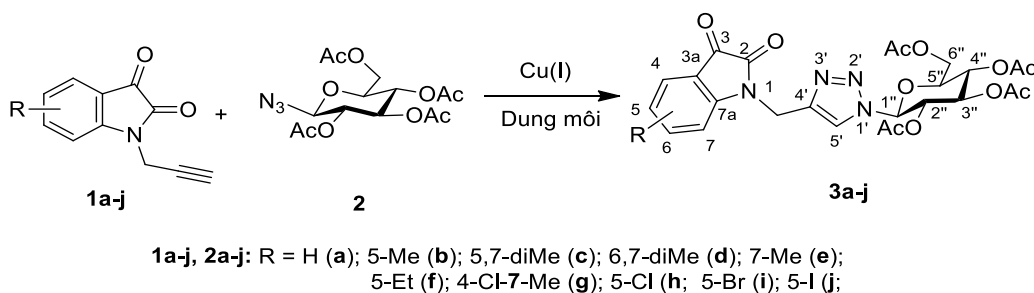
$$IC_{50} = High_{Conc} - \frac{(High_{Inh\%} - 50) \times (High_{Conc} - Low_{Conc})}{High_{Inh\%} - Low_{Inh\%}}$$

Trong đó, High_{Conc}/Low_{Conc}: chất thử ở nồng độ cao/chất thử ở nồng độ thấp; High_{Inh%}/Low_{Inh%}: % ức chế ở nồng độ cao/% ức chế ở nồng độ thấp.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tổng hợp một số hợp chất 1,2,3-triazole

10 hợp chất chứa dị vòng 1,2,3-triazole được tổng hợp bằng phản ứng click giữa hợp phần isatin và azide. Sơ đồ phản ứng được thể hiện như Hình 1. Các hợp chất 1,2,3-triazole tồn tại ở dạng rắn, màu vàng, nhiệt độ nóng chảy của các chất biến động lớn phụ thuộc vào nhóm chức gắn vào vòng isatin. Hiệu suất phản ứng đạt được khá cao (60-86%). Các hợp chất sau tổng hợp đã được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại, bao gồm phổ IR, NMR và MS [19].



Hình 1. Sơ đồ phản ứng tổng hợp một số hợp chất 1,2,3-triazole

3.2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào

Độc tính tế bào của 10 hợp chất lai 1,2,3-triazole-isatin thuộc dãy 3a-j đã được đánh

giá thông qua sự ức chế tế bào trên hai dòng tế bào ung thư biểu mô KB (CCL-17TM) và ung thư gan HepG2 (HB-8065TM) bằng

phương pháp được phát triển bởi Monks và cộng sự [21]. Kết quả được thể hiện trong Bảng 1. Trong phạm vi thử nghiệm này, trong số 10 hợp chất mới của dãy **3a-j**, có 05 hợp chất thể hiện khả năng ức chế dòng tế bào ung thư KB và HepG2.

Đối với dòng tế bào KB, hoạt tính ức chế của hợp chất **3c** tốt nhất với giá trị IC_{50} là $83,2 \pm 1,35$; các hợp chất thể hiện hoạt tính khác theo thứ tự giảm dần là **3j** ($85,76 \pm 2,4$), **3e** ($89,35 \pm 2,0$), **3d** ($89,60 \pm 1,9$) và **3g** ($91,84 \pm 1,5$). Các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính ($IC_{50} >$

128) [22].

Đối với dòng tế bào HepG2 hoạt tính ức chế của hợp chất **3j** tốt nhất với giá trị IC_{50} là $29,5 \pm 0,5$; các hợp chất thể hiện hoạt tính khác theo thứ tự giảm dần là **3c** ($81,58 \pm 1,5$), **3g** ($81,13 \pm 1,8$), **3e** ($83,12 \pm 1,9$) và **3d** ($86,86 \pm 2,0$). Các hợp chất còn lại không thể hiện hoạt tính ($IC_{50} > 128$).

Như vậy, một số hợp chất của dãy **3a-j** đều thể hiện hoạt tính kháng tế bào ung thư tuy nhiên, hiệu quả của chúng kém hơn so với chất tham chiếu ellipticine.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính kháng tế bào ung thư của một số hợp chất thuộc dãy chất **3a-j**

STT	Hợp chất	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ ức chế dòng tế bào ung thư	
			KB	HepG2
1	3a	128	40	44
		32	10	2
		8	2	0
		2	0	0
		IC_{50}	> 128	> 128
2	3b	128	14	12
		32	9	3
		8	0	0
		2	0	0
		IC_{50}	> 128	> 128
3	3c	128	92	94
		32	2	3
		8	0	0
		2	0	0
		IC_{50}	$83,2 \pm 1,35$	$81,58 \pm 1,5$
4	3d	128	74	80
		32	14	10
		8	8	2
		2	0	0
		IC_{50}	$89,60 \pm 1,9$	$86,86 \pm 2,0$
5	3e	128	81	86
		32	4	9
		8	2	0
		2	0	0
		IC_{50}	$89,35 \pm 2,0$	$83,12 \pm 1,9$
6	3f	128	25	10
		32	14	0
		8	0	0
		2	0	0
		IC_{50}	> 128	> 128
7	3g	128	79	93
		32	2	3
		8	0	0
		2	0	0

STT	Hợp chất	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ ức chế dòng tế bào ung thư	
			KB	HepG2
8	3h	IC ₅₀	91,84 ± 1,5	82,13 ± 1,8
		128	38	42
		32	8	0
		8	4	0
		2	0	0
		IC ₅₀	> 128	> 128
9	3i	128	24	31
		32	15	0
		8	0	0
		2	0	0
		IC ₅₀	> 128	> 128
10	3j	128	72	97
		32	22	57
		8	2	0
		2	0	0
		IC ₅₀	85,76 ± 2,4	29,5 ± 0,5
Ellipticine		IC ₅₀	0,31 ± 0,05	0,33 ± 0,05

Trong quá trình nghiên cứu mối quan hệ giữa cấu trúc - hoạt tính, chúng tôi nhận thấy rằng, nhóm thế trên dị vòng isatin có vai trò quan trọng, quyết định đến hoạt tính gây độc tế bào ung thư của dãy các hợp chất chứa dị vòng isatin. Hợp chất **3a** (R = H) không thể hiện hoạt tính, trong khi đó các hợp chất mang vòng isatin chứa nhóm thế 5,7-dimethyl; 6,7-dimethyl; 7-methyl, 4-chloro-7-methyl và 5-iodo thể hiện hoạt tính ức chế tế bào ung thư, đặc biệt nhóm thế 5,7-dimethyl và 5-iodo có vai trò lớn nhất đối với việc tăng hoạt tính so với isatin không chứa nhóm thế.

Tuy nhiên, các nhóm thế đính vào vòng isatin thể hiện hoạt tính không tuân theo quy luật, các nhóm đẩy electron theo hiệu ứng +I và +C vào vòng (5,7-dimethyl; 6,7-dimethyl; 7-methyl, 5-iodo) đều thể hiện hoạt tính, nhưng các hợp chất **3b**, **3f** cũng chứa nhóm đẩy electron lại không thể hiện hoạt tính. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước về hợp chất lai 1,2,3-triazole-isatin có gắn với các dị vòng thơm hoặc nhóm alkyl cho thấy, có nhiều hợp chất thể hiện hoạt tính chống ung thư với IC₅₀ tốt. Do đó, có thể nhận thấy rằng, hợp phần monosaccharide ở

dạng acetyl hóa ít nhiều đã làm hạn chế hoạt tính của kiểu chất này, từ đó để nâng cao hoạt tính ức chế tế bào ung thư cần phải có thêm những nghiên cứu để thay đổi cấu trúc của hợp phần monosaccharide trong phân tử.

4. KẾT LUẬN

Một số hợp chất dị vòng 1,2,3-triazole đã được tổng hợp bằng phản ứng click giữa 2 hợp phần isatin và monosaccharide chứa nhóm azide, sử dụng xúc tác CuI. Các sản phẩm sau khi xác nhận cấu trúc bằng các phương pháp hóa lý như IR, NMR, MS đã được đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư biểu mô và ung thư gan. Kết quả cho thấy, có 05/10 hợp chất có khả năng gây độc tế bào đối với hai dòng tế bào ung thư trên với giá trị IC₅₀ tốt nhất là 83,2 $\pm$ 1,35 và 29,5 $\pm$ 0,5. Mặc dù hoạt tính thu được kém hơn so với chất tham chiếu ellipticine, những kết quả thu được có ý nghĩa định hướng cho những nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Ershov P., Ivanov A., (2018). Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: A review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their

- biomedical implications. *BioFactors*, **44**(2), 95-108.
- [2] Pakravan P., Kashanian S., Khodaei M. M., Harding F. J., (2013). Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. *Pharmacological Reports.*, **65**(2), 313-335.
 - [3] Nath R., Pathania S., Grover G., Akhtar M. J., (2020). Isatin containing heterocycles for different biological activities: Analysis of structure activity relationship. *Journal of Molecular Structure*, **1222**, 128900.
 - [4] Gupta A. K., Tulsyan S., Bharadwaj M., Mehrotra R., (2019). Systematic Review on Cytotoxic and Anticancer Potential of N-Substituted Isatins as Novel Class of Compounds Useful in Multidrug-Resistant Cancer Therapy: In Silico and In Vitro Analysis. *Topics in Current Chemistry*, **377**(3), 15.
 - [5] Vine K. L., Matesic L., Locke J. M., Ranson M., Skropeta D., (2009). Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives: a comprehensive review from 2000-2008. *Anticancer Agents Medicinal Chemistry*, **9**(4), 397-414.
 - [6] Guo H. et. al., (2019). Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **164**, 678-688.
 - [7] Chohan Z. H., Pervez H., Rauf A., Khan K. M., Supuran C. T., (2004). Isatin-derived antibacterial and antifungal compounds and their transition metal complexes. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, **19**(5), 417-423.
 - [8] Sridhar S. K., Pandeya S. N., Stables J. P., Ramesh A., (2002). Anticonvulsant activity of hydrazones, Schiff and Mannich bases of isatin derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **16**(3), 129-132.
 - [9] Xu Z., Zhang S., Gao C., Fan J., Zhao F., Lv Z.-S., Feng L.-S., (2017). Isatin hybrids and their anti-tuberculosis activity. *Chinese Chemical Letters*, **28**(2), 159-167.
 - [10] Sriram D., Yogeewari P., Meena K., (2006). Synthesis, anti-HIV and antitubercular activities of isatin derivatives. *Pharmazie*, **61**(4), 274-277.
 - [11] Andreani A., Burnelli S., Granaiola M., Leoni A., Locatelli A., Morigi R., Rambaldi M., Varoli L., Cremonini M. A., Placucci G., Cervellati R., Greco E., (2010). New isatin derivatives with antioxidant activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(4), 1374-1378.
 - [12] Jamil W., Solangi S., Ali M., Khan K. M., Taha M., Khuhawar M. Y., (2019). Syntheses, characterization, in vitro antiglycation and DPPH radical scavenging activities of isatin salicylhydrazidehydrazone and its Mn (II), Co (II), Ni (II), Cu (II), and Zn (II) metal complexes. *Arabian Journal of Chemistry*, **12**(8), 2262-2269.
 - [13] Sharma P. K., Balwani S., Mathur D., Malhotra S., Singh B. K., Prasad A. K., Len C., Van der Eycken E. V., Ghosh B., Richards N. G., Parmar V. S., (2016). Synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of novel triazolyl-isatin hybrids. *Journal of Enzyme Inhibition Medicinal Chemistry*, **31**(6), 1520-1526.
 - [14] Lahari K., Sundararajan R., (2020). Design and synthesis of novel isatin derivatives as potent analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial agents. *Journal of Chemical Sciences*, **132**(1), 94.
 - [15] Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V., (2005). Isatin: Role in stress and anxiety. *Stress*, **8**(3), 175-183.
 - [16] Araújo A. R. L., Tomé A. C., Santos C. I. M., Faustino M. A. F., Neves M. G. P. M. S., Simões M. M. Q., Moura N. M. M., Abu-Orabi S. T., Cavaleiro J. A. S., (2020). Azides and Porphyrinoids: Synthetic Approaches and Applications,

Part 1-Azides, Porphyrins and Corroles. *Molecules*, **25**(7), 1662.

- [17] Kolb H. C., Finn M. G., Sharpless K. B., (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, **40**(11), 2004-2021.
- [18] Rostovtsev V. V., Green L. G., Fokin V. V., Sharpless K. B., (2002). A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, **41**(14), 2596-2599.
- [19] Nguyễn Minh Trí, (2022). Nghiên cứu tổng hợp và tính chất của một số hợp chất 1,2,3-triazol có chứa đồng thời vòng isatin và hợp phần monosaccaride bằng phản ứng click. Luận án Tiến sĩ Hóa học. Học viện Khoa học và Công nghệ.
- [20] Mosmann T. et. al., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**(1-2), 55-63.
- [21] Scudiero D.A., Shoemaker R.H., Kenneth D.P., Monks A., Tierney S., Nofziger T.H., Currens M.J., Seniff D., Boyd M.R., (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, **48**, 4827-4833.
- [22] Giang Thị Kim Liên, Đào Hùng Cường, (2017). Một số nghiên cứu về thành phần hóa học của tinh dầu vôi và dịch chiết n-hexane của lá và nụ cây vôi thu hái ở tỉnh Quảng Nam, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng*, **9**(118), 104-108.