

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA, KATEDRA  
FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

# Rigorózní práce

---

Chalkony a jejich analogy jako potenciální  
léčiva X.

**Lenka Richterová**



Hradec Králové

2016

*Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.*

*Rigorózní práce vznikla za podpory grantu SVV-2015-260-183*

V Hradci Králové 1. 2. 2016

Podpis.....

## Poděkování

*Doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za její laskavé vedení, obětavost a rady při tvorbě této práce.*

*Paní Věnceslavě Hronové za provedení elementární analýzy a paní Ivě Vencovské za změření IČ spekter*

*Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změření a interpretaci NMR spekter.*

*Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D. a jejím spolupracovníkům za provedení antifungálních testů.*

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

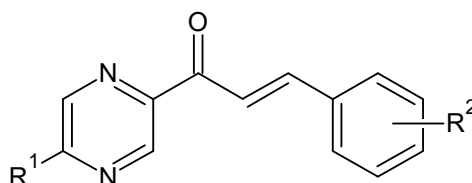
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát Mgr. Lenka Richterová

Konzultant doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Název rigorózní práce Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva X.

Teoretická část práce je věnována současným poznatkům léčby mykóz. Dále jsou zde uvedeny příklady přírodních chalkonů s antifungálním účinkem a popsány různé možnosti obměny struktury a jejich vliv na antifungální vlastnosti těchto látek. Experimentální část pojednává o syntéze fluorovaných (2*E*)-3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onů (Obr. 1).



$R^1 = \text{H, } \textit{tert}$ -butyl, isobutyl, butyl, propyl

$R^2 = 2\text{-F, } 4\text{-F}$

**Obr. 1** Struktura studovaných sloučenin

Látky byly získány Claisen-Schmidtovou kondenzací v pyridinu za použití diethylaminu jako kondenzačního činidla. Výsledkem byla jedna již dříve popsaná sloučenina a čtyři nové látky. U produktů byla potvrzena struktura pomocí IČ a NMR spektra a jejich čistota ověřena pomocí teploty tání a elementární analýzy. Antifungální aktivita připravených sloučenin byla hodnocena mikrodiluční bujónovou metodou proti osmi kmenům patogenních hub. Nejvyšší aktivitu měly v obou sériích deriváty, kde  $R^1 = \text{H}$ . Byly více nebo méně účinné proti kvasinkám rodu *Candida* (MIC = 15.63–125  $\mu\text{mol/l}$ ) a dermatofytu *Trichophyton mentagrophytes* (MIC = 7.81–15.63  $\mu\text{mol/l}$ ). Jejich účinnost byla srovnatelná s dříve připravenými (2*E*)-3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ony, kde  $R^1 = R^2 = \text{H}$ .

# ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

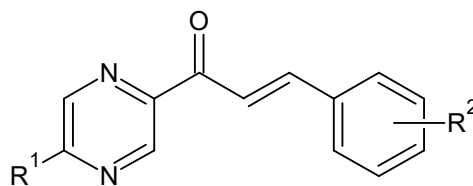
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate Mgr. Lenka Richterová

Consultant Assoc. Prof. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Title of Thesis Chalcones and their analogues as potential drugs X.

Theoretical part of the thesis is devoted to current possibilities in the treatment of mycoses. Some examples of natural chalcones with antifungal properties are given, and various modifications of their structures and the influence of these modifications on antifungal activity are described. Experimental part deals with the synthesis of fluorinated (*2E*)-3-phenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones (Obr. 1).



$R^1 = \text{H, } tert\text{-butyl, isobutyl, butyl, propyl}$

$R^2 = 2\text{-F, } 4\text{-F}$

**Obr. 1** Structure of the studied compounds

The compounds were obtained by the Claisen-Schmidt condensation in pyridine using diethylamine as condensing agent. The syntheses yielded one compound already reported in literature and four novel analogs. The structures of the products were corroborated by means of IR and NMR spectra and their purity checked by melting point and elemental analysis. Antifungal activity of the prepared compounds was evaluated by microdilution broth method against eight strains of pathogenic fungi. The highest potency in both series exhibited derivatives with  $R^1 = \text{H}$ . They were more or less active against yeasts of *Candida* spp. (MIC = 15.63–125  $\mu\text{mol/l}$ ) and dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* (MIC = 7.81–15.63  $\mu\text{mol/l}$ ). Their potency was comparable with previously prepared (*2E*)-3-phenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones, where  $R^1 = R^2 = \text{H}$ .

### **Seznam zkratk**

CFU	colony forming unit (kolonii tvořící jednotka)
EDG	electron-donating group (elektrony dodávající skupina)
EWG	electron-withdrawing group (elektrony odtahující skupina)
FAS	fatty acid synthase (synthasa mastných kyselin)
MIC	minimal inhibitory concentration (minimální inhibiční koncentrace)
spp.	Species

## Obsah

1. Úvod a cíl práce .....	8
2. Mykózy.....	10
2.1. Mykózy – problém dnešní medicíny .....	10
2.2. Rozdělení mykóz.....	11
2.2.1. Dermatomykózy .....	12
2.2.2. Systémové mykózy.....	13
2.3. Původci systémových a nosokomiálních mykóz.....	15
2.3.1. Kandidóza .....	15
2.3.2. Aspergilóza .....	15
2.3.3. Kryptokokóza.....	16
2.3.4. Mukormykóza .....	17
2.3.5. Vzácné mykózy .....	17
3. Antimykotika .....	19
4. Antifungálně účinné chalkony .....	27
4.1. Mechanismus antifungálního účinku chalkonů.....	27
4.2. Přírodní chalkony s antifungálním účinkem.....	30
4.3. Syntetické obměny přírodních chalkonů .....	36
4.3.1. Substituce benzenových jader .....	37
4.3.2. Heterocyklické analogy chalkonů .....	43
5. Experimentální část.....	55
5.1. Obecný postup přípravy (2 <i>E</i> )-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(fluorfenyl) prop-2-en-1-onů.....	56
5.2. (2 <i>E</i> )-3-(2-fluorfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (95) .....	57
5.3. (2 <i>E</i> )-1-(5- <i>terc</i> -butylpyrazin-2-yl)-3-(2-fluorfenyl)prop-2-en-1-on (96) .....	58
5.4. (2 <i>E</i> )-3-(2-fluorfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (97) .....	59
5.5. (2 <i>E</i> )-3-(4-fluorfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (98).....	60
5.6. (2 <i>E</i> )-1-(5- <i>terc</i> -butylpyrazin-2-yl)-3-(4-fluorfenyl)prop-2-en-1-on (99) .....	61
5.7. Hodnocení antifungální aktivity.....	62
6. Diskuse.....	63
7. Závěr .....	66
8. Literatura .....	68

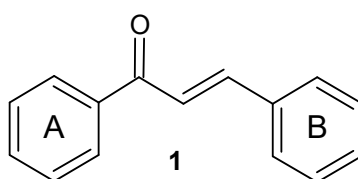
## 1. Úvod a cíl práce

V posledních desetiletích nabývají mykotické infekce na důležitosti jako jedny z hlavních příčin morbidity a často i mortality pacientů s vážným imunodeficitem a to především nemocných s AIDS, orgánovými transplantacemi nebo pacientů po dlouhodobé léčbě antibakteriálními látkami či po invazivních medicínských zákrocích. Pozornost je třeba věnovat nárůstu výskytu invazivní kandidózy a aspergilózy u hematologických pacientů, pacientů po transplantaci kostní dřeně, dále u kriticky nemocných na jednotkách intenzivní péče. Mezi nejčastější oportunní mykózy patří kandidózy, způsobené kmenem *Candida albicans*. Kandidózy jsou považovány za čtvrtou nejčastější příčinu sepse v nemocničním prostředí a zabíjejí 40% infikovaných pacientů. Účinnost chemoterapie u diseminovaných infekcí klesá kvůli mimořádnému zvýšení výskytu lékové rezistence, zahrnující i kombinovanou léčbu. Proto je nutné hledat nové antifungální látky jako alternativu k těm již používaným. Nové látky by měly být spíše fungicidní než fungistatické a měly by působit na klinicky významné druhy hub. Samozřejmostí je možnost jejich systémového podávání. Naneštěstí je soubor klinicky používaných antimykotik velmi limitovaný, hlavně kvůli malému počtu molekulárních cílů antimykotické léčby. Buněčná stěna hub a enzymy účastníci se biosyntézy a kompletace jejích částí jsou považovány za slibné cíle, zvláště proto, že buněčná stěna je pro tyto organismy nezbytná a nevyskytuje se v savčích buňkách. Selektivní inhibitory biosyntézy  $\beta(1\rightarrow3)$ glukanu a chitinu, jsou proto žádanými kandidáty pro farmaceutické využití<sup>1,2,3</sup>.

Farmaceutická fakulta Karlovy univerzity v Hradci Králové se výzkumu antifungálních a antibakteriálních sloučenin věnuje již řadu let. Velká pozornost je mimo jiné věnována výzkumu nových analogů chalkonů. Chalkony jsou přírodní látky, pro které je typické spojení dvou aromatických jader  $\alpha,\beta$ -nenasyceným řetězcem s karbonylovou skupinou. Dle jejich chemické struktury je můžeme označit jako deriváty 1,3-difenyprop-2-en-1-onu (fenylstyrylketonu)**1**. Mohou existovat v *cis* nebo *trans* formě. Jsou otevřenými analogy flavonoidů, přičemž v rostlinách slouží jako jejich prekurzory. Na rozdíl od ostatních flavonoidů se v semitriviálních názvech kruh A čísluje čárkovaně a kruh B bez čárek. Uplatňují se také jako koncové produkty biosyntézy flavonoidů a to jako obrané sloučeniny např. při interakci s hmyzem. Chalkony mají většinou žlutou barvu, proto se v rostlinách podílejí na zbarvení různých orgánů, např. květů. V přírodě jsou široce rozšířeny v ovoci,

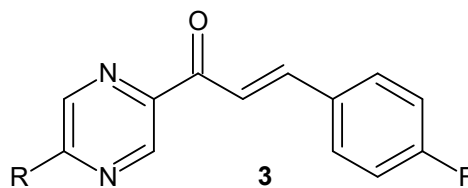
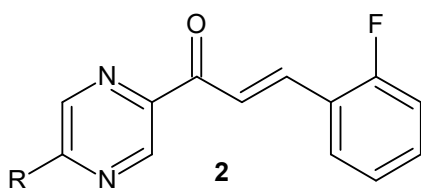


zelenině, koření, čaji a sóje. Velké množství v přírodě se vyskytujících chalkonů má aromatická jádra hydroxylována. Schopnost fenolické skupiny zhaset radikály a výskyt tohoto seskupení u chalkonů vede k zájmu použít chalkony či je obsahující rostliny jako léčiva. Dalšími v přírodě běžnými substituenty aromatických jader chalkonů jsou methoxy a alkenyl skupiny. Byla popsána řada farmakologických vlastností chalkonů, jako je např. protizánětlivá, antibakteriální, antifungální, antivirová, antiprotozoální, antioxidační, cytotoxická či protinádorová aktivita<sup>4,5,6,7</sup>.



Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv se věnuje obměnám ve struktuře chalkonů, které by vedly k zvýšení antimikrobiální a antifungální aktivity. V literatuře jsou popsány řady analogů chalkonů, které byly syntetizovány za účelem zlepšení jejich biologických vlastností. Jako substituenty aromatického jádra chalkonů přicházejí v úvahu halogeny, alkyly, alkoxylové-, amino-, kyano-, amido- a karboxyové skupiny. Další možností obměny struktury je záměna benzenového jádra za různé heterocykly, annulované kruhy a další. Zajímavým se z hlediska antimikrobiální aktivity jeví pyrazin. Látky obsahující ve své molekule pyrazin, jsou používány jako antituberkulotika. Některé molekuly mající ve své struktuře pyrazin byly testovány jako antifungální látky a jako herbicidy<sup>6, 7,8</sup>.

Mým úkolem bylo syntetizovat (2*E*)-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(2-fluorfenyl)prop-2-en-1-ony obecné struktury **2** a (2*E*)-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(4-fluorfenyl)prop-2-en-1-ony **3**. Obměna spočívá v záměně kruhu A za pyrazin a v substituci tohoto kruhu v poloze 5 alkylem, kruh B nese v *para* nebo *ortho* poloze atom fluoru.



## 2. Mykózy

### 2.1. Mykózy – problém dnešní medicíny

První, kdo použil pojem mykóza pro infekční onemocnění vyvolané houbami, byl Rudolf Virchow. Houby se vyskytují přirozeně v lidském prostředí a jsou prakticky všudypřítomné. Jako zdroje infekce mohou sloužit jak kvasinky, které jsou součástí lidské mikroflóry, tak plísně, rostoucí na rostlinných materiálech, uhynulých zvířatech, i spory uvolňované do ovzduší. Většina hub, způsobující infekce v prostředí nemocnice, jsou saprofyti, kteří potřebují pro množení příznivé životní podmínky. To je především teplo, vlhko a snížení redox potenciálu. Výskyt mykotických infekcí zvláště u vážně nemocných stále stoupá, proto se stávají významným problémem dnešní medicíny. Na zvýšeném výskytu mykotických onemocnění se podílí dlouhodobá terapie širokospektrými antibiotiky, imunosupresivy, kortikoidy, cytostatiky a dalšími látkami snižujícími imunitní odolnost organismu. Tato léčiva mají vysokou účinnost na primární onemocnění, ale samozřejmě i velké množství nežádoucích účinků. Z hlediska následné mykotické infekce je nejdůležitější oslabení hemopoetického systému a imunitního systému. Navíc patogenní organismy zvyšují svoji virulenci, popřípadě se stávají rezistentními na používaná antimykotika. Dále se objevují i nové druhy, které zatím nebyly jako patogeny pro člověka známy. Tyto jsou spojeny hlavně s imunosuprimovanými pacienty. Zde dochází k oportunním infekcím kmeny, které jsou pro zdravého člověka zcela neškodné. Proto také není zdrojem infekce nemocný člověk<sup>9,10</sup>.

Mezi nemoci predisponující k mykózám patří:

1. **Primární (vrozené) a sekundární (získané) imunodeficience:** kongenitální imunodeficience, thymická dysplazie, AIDS aj.
2. **Nádory krvetvorných a lymfoidních tkání (leukemie, maligní lymfomy),** případně **generalizace karcinomu** provázené defektem celulární, ev. humorální imunity.
3. **Různá krevní onemocnění včetně lézí kostní dřeně** spojená s leukopenií hypogamaglobulinemií. Též terminální fungemie u febrilních granulocytopenických pacientů.
4. **Celková metabolická a endokrinní onemocnění,** např. malabsorpční a malnutriční syndromy dětí při onemocnění GIT, chronická uremie (hemodialyzační režim) a zejména diabetes mellitus<sup>10</sup>.

Kromě výše zmíněných nemocí jsou i další příčiny mykotických infekcí, které by se daly zařadit mezi iatrogenní. Patří sem chirurgické výkony (např. operace srdce, transplantace orgánů), avšak ke přímé kontaminaci chirurgickými nástroji dochází jen zřídka. U transplantace byly popsány případy infekce z ledviny od mrtvého dárce. Dále se jedná o rentgenové ozáření oslabující imunitní systém. Výjimečně může dojít k přenosu při infuzi roztoků do krve či katetrizaci apod. Zde hraje velkou roli adheze infekčního agens k umělým povrchům. Náchylní k mykotickým infekcím jsou též pacienti na jednotkách intenzivní péče. Mykózy komplikují léčbu, prodlužují dobu hospitalizace a celkově vedou k vyšším nákladům na léčbu <sup>2, 9, 10, 11</sup>.

Vliv na mykotické infekce mají i další vlastnosti organismu. Je znám vliv estrogenů na růst *Candida albicans* a *Coccidioides immitis*, které patří mezi původce kvasinkových onemocnění. Hormony stimulují přeměnu kandid z kvasinkové formy na formu tvořící vlákna, která je více patogenní. Kandidózami trpí více ženy užívající hormonální antikoncepci či substituci obsahující estrogenní složku a také těhotné ženy. Změny tkání, zvláště pak chronické (nezhojené rány, spáleniny) vedoucí k snížení redox potenciálu, zvyšují náchylnost k mykózám. Dále hraje roli věk, pacienti nad 75 let často trpí povrchovými mykózami, které se výjimečně mohou při chirurgickém zákroku či zranění dostat do systému. Malnutrice pak hraje roli u alkoholiků a u drogově závislých, kde je navíc riziko přenosu infekce při nehygienické intravenózní aplikaci návykových látek <sup>9, 10</sup>.

Oportunní houbové patogeny jsou častými původci nosokomiálních infekcí. Bohužel nemají většinou charakteristické příznaky, proto je jejich časný záchyt, kdy je ještě možná léčba, obtížný. V diagnostice hraje významnou úlohu mykologická laboratoř, v posledních letech je rozvoj laboratorní diagnostiky rychlý. I přes to je řada infekcí diagnostikována až po smrti pacienta. Ze všech výše uvedených důvodů vyplývá, že problematika mykóz nabývá na významu a i do budoucna je třeba ji věnovat patřičnou pozornost <sup>9</sup>.

## 2.2. Rozdělení mykóz

Mykózy můžeme rozdělit na povrchové mykózy, mezi něž patří onemocnění sliznic a kůže tzn. dermatomykózy, a na hluboké neboli systémové mykózy či jinak řečeno invazivní <sup>2, 10</sup>.

### 2.2.1. Dermatomykózy

Primární onemocnění způsobují dermatofyty a *Cryptococcus neoformans*. Ostatní kvasinky a plísně jsou původci sekundárních infekcí u pacientů s predispozičními faktory.

- **Dermatofyty** jsou nejčastějšími primárními původci onemocnění kůže a kožních adnex (vlasy, vousy, chlupy a nehty). Je tomu proto, že se jim mimořádně daří ve tkáních obsahujících keratin (keratinofilní houby). Postihují povrchové vrstvy kůže. Dermatofytózy jsou rozšířeny po celém světě a napadají i další živočichy včetně ptáků. Dermatofyty můžeme dělit z epidemiologického hlediska podle primárního hostitele do skupin:
  - **antropofilní**, kde primárním hostitelem je člověk – *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Epidermatophyton floccosum*,
  - **zoofilní**, kde je primárním hostitelem zvíře, které může infikovat člověka – *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum canis*,
  - **geofilní** kontaminující půdu a příležitostně mohou být patogenní pro člověka i zvířata – *Trichophyton terrestre*, *Microsporum gypseum* <sup>2</sup>.
- **Kvasinkové organismy** postihují nejčastěji sliznice, hlavně sliznici dutiny ústní (orální kandidóza, stomatitis). U žen způsobují vulvovaginální kandidózu, u mužů se vyskytuje kandidová balanitida, při terapii by se pak mělo dbát na léčbu obou sexuálních partnerů pro zamezení zpětného přenosu. Dále může dojít k chronické mukokutánní kandidóze u imunosuprimovaných a dětských pacientů a nemocných s cukrovkou. Kůži postihují nejčastěji v místech zapaření (intertrigo) a při zranění v místě nehtového lůžka (kandidové paronychium), mohou postihovat nehty (kandidová onychomykóza). Nejdůležitější vyvolavatele představují *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* a *C. tropicalis*, ale i další lipoidní kvasinkové houby z rodu *Malassezia* (*Malassezia furfur*), které způsobují onemocnění pityriasis versicolor <sup>2,10</sup>.
- **Oportunní mikromycety** vyvolávají infekce kůže u imunitně oslabených jedinců. Jde nejčastěji o saprofyty rodu *Aspergillus* a dále o zygomykózy (*Mucor*, *Rhizopus* a další); tyto vláknité houby mohou pronikat do hlubších vrstev kůže. Mohou také postihovat nosální a paranasální dutiny, oči a rohovku. U onychomykóz se jedná o agens *Scopulariopsis brevicaulis*. Infekce může být také diseminovaná z primárního ložiska (např. plíce) nebo postihuje kůži s traumaty (popáleniny) <sup>2,10</sup>.

- **Onychomykózy** postihují lůžka nehtů na rukou a nohou, patří k běžným formám povrchových mykóz, případně se může vyvinout i mykotické postižení paronychia. Nejčastějším původcem bývá *T.rubrum* či *T.mentagrophytes*, vyskytuje se i *onychomycosis candidomycotica* (*C.albicans*). Kromě dermatofytů způsobuje onychomykózycelá řada mykopatogenů (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scopulariopsis*)<sup>10</sup>.

Kožní a slizniční onemocnění způsobená kvasinkami či plísněmi jsou velmi častá u těžce nemocných imunodeficientních pacientů, nemocných s cukrovkou a zvláště pak u starších lidí, kteří mají poruchy periferní mikrocirkulace. Dalším rizikovým faktorem je nedostatečná či nevhodná osobní hygiena (ponožky, obuv, dentální protézy atd.), návštěva sportovních areálů a jiných míst se společným hygienickým zázemím. Mohou se dokonce stát příčinou zdravotních komplikací, např. při operacích či při diseminaci ze sliznice na jiná místa v organismu. Proto i jejich léčbě je třeba věnovat pozornost<sup>9, 10, 11</sup>.

### 2.2.2. Systémové mykózy

Systémové mykózy se týkají všech medicínských oborů. Jedná se o oportunní infekce způsobené přirozeně se vyskytujícími kmeny kvasinek a plísní. Ve většině případů se jedná o sekundární infekce pacientů s rizikovými faktory. Sekundární mykózy ohrožují tyto pacienty na životě, komplikují léčebné postupy, vyskytují se jako nosokomiální infekce<sup>2, 11</sup>.

Podle způsobu nákazy dělíme mykotické infekce na exogenní a endogenní.

- **Infekce exogenní**– získané z vnějšího prostředí. Zdrojem je vzduch nemocničních pokojů, kůže a sliznice nemocných, předměty i potrava. K nákaze dojde inhalací, infekcí ran nebo popálenin. Výjimečně mohou infekce vznikat iatrogeně zavlečením do organismu zdravotnickým zásahem<sup>2</sup>.
- **Infekce endogenní**–příčinou je buď přemnožení komensální saprofytické flóry (kandidy), nebo může dojít k růstu z dosud latentního ložiska infekce a k diseminaci do ostatních orgánů. Infekce se šíří postupem přes stěnu střev a stěnu cév, s následnou fungemií (výskyt hub v krvi), která může vést až k septickým formám generalizovaných mykóz (hlavně je-li pacient postižen granulocytopenií). Plísně prorůstají stěnou cév, kde vytvářejí mycelium, které ve spojitosti se srážlivými faktory vyvolává trombózy,

což vede k místním infarktům až nekrotickým. K nárůstu invazivity houbových infekcí přispívá významně snížení funkce imunitního systému<sup>2, 9, 10, 11</sup>.

Lidský organismus je neustále vystaven působení hub, které jsou v našem prostředí všudypřítomné. V obraně proti mykotickým infekcím hraje roli řada mechanismů, obdobných obraně proti bakteriím, virům či parazitům. Uplatňují se především přirozené bariéry, dále nespecifická obrana a v neposlední řadě získaná imunita. Následující přehled rozepisuje jednotlivé mechanismy podílející na odolnosti proti mykózám u zdravého hostitele:

- **Nespecifická rezistence**– genetické faktory, věk, pohlaví, hormonální vlivy aj.
- **Přirozené bariéry**– kůže, sliznice, sekrety na sliznicích (nízké pH), činnost řasinek buněk sliznice dýchacích cest, fyziologická flóra, neporušené osídlení.
- **Specifická odpověď**– vnitřní obranné mechanismy po průniku mykopatogenu bariérami do tkáně. Jedná se o zánětlivou odpověď, fagocytózu a imunitní odpověď<sup>10</sup>.

## 2.3. Původci systémových a nosokomiálních mykóz

Mezi nejčastější invazivní infekce patří invazivní kandidóza a invazivní aspergilóza. Horák uvádí přibližně toto zastoupení infekčních původců: *Candida spp.* (60 až 80%), *Aspergillus spp.* (15 až 30%), *Cryptococcus* (2%)<sup>2,12</sup>.

### 2.3.1. Kandidóza

Kandidózy jsou nejčastějšími mykózami celosvětově. Je to dáno tím, že se jedná o ubikvitární saprofyty, kteří jsou součástí lidské mikroflóry, osídlují lidskou kůži, sliznice a dokonce i gastrointestinální trakt. Za normálních podmínek u zdravých lidí nevyvolávají potíže. Vyskytují se převážně jako blastospory (kvasinková forma), ale protože se jedná o dimorfní houby, jsou schopny vytvářet i vláknité formy, které jsou považovány za patogenní. Kvasinková forma je totiž lépe fagocytována neutrofily než vláknitá. Za určitých podmínek pronikají střevní stěnou a mohou napadat kterýkoli orgán. Náchylnější k této endogenní infekci jsou lidé s poruchou buněčné imunity a s neutropenií. Kandidózy se objevují hlavně u novorozenců a kojenců, těhotných žen. U kachektických a imunosuprimovaných nemocných se jedná o oportunní infekce, stejně jako u diabetiků a pacientů s jinou hypofunkční endokrinopatií<sup>2,9,10,12</sup>.

Kandidy jsou častými původci nosokomiálních nákaz. V současné době se navyšuje podíl infekcí způsobených non-albicans kmeny (především *C.krusei* a *C.glabrata*). Je to důsledek používání antimykotických léků, v tomto případě flukonazolu, který má vyšší účinnost na *C. albicans* než na výše uvedené kmeny. Nejen proto je zapotřebí nalézat nové antifungální látky<sup>2,12</sup>.

### 2.3.2. Aspergilóza

Aspergily jsou oportunní patogeny, vyskytující se běžně v prostředí. Jsou to ubikvitární saprofyti, kteří byli v souvislosti s infekcí lidského organismu prokázáni např. v kořeni, čaji, suchých květinách, v marihuaně, ve zdivu budov, ve ventilačním systému nemocničních pokojů. Aspergily tvoří za běžných podmínek kolonie plísňového typu, se septovanými hyfami a hlavicemi nesoucími konidie (konidiofory). Spóry (konidie) lze najít v půdě, ve vzduchu, na tlejících rostlinách a na uhynulých zvířatech. Velkým rezervoárem jsou komposty. Spóry jsou veliké asi 3–5 μm, pro svůj rozměr se snadno inhalací dostanou až do alveolů plic. K přenosu z nemocného na jiného člověka nedochází. Infekce zanesená

do organismu lékařskými nástroji po operaci je vzácná. Inhalované konidie ztrácí svou povrchovou hydrofobní vrstvu, nejprve zduří, pak klíčí a vytvářejí mycelium, které prorůstá tkáněmi <sup>2, 11, 13</sup>.

Rod *Aspergillus* zahrnuje asi 900 kmenů a jen přibližně 20 je patogenních pro člověka, z nichž nejvíce infekcí působí *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulus*. Aspergilózy mohou vyvolávat celou řadu příznaků od benigní kolonizace (která je přesto považována za kolonizaci infekční) po závažné diseminované formy, které zůstávají významnou příčinou úmrtí neutropenických pacientů. Infekce aspergily postihuje především nemocné s poruchou granulocytárních funkcí, léčených kortikosteroidy, cytostatickou léčbou či po transplantacích. V obraně proti exogenní infekci se v prvé řadě uplatňují alveolární makrofágy, které inhalované spóry fagocytují, a tak zabrání vyklíčení. V případě průniku do tkáně jsou dominantní neutrofily, které mají schopnost bez fagocytózy ničit vláknité hyfy <sup>11, 12</sup>.

Nejčastější je plicní forma aspergilózy, ostatní orgány jsou postiženy jen ve 20 až 30 % případů (jsou to např. paranazální dutiny, mozek, GIT, játra, ledviny), přičemž většinou doprovázejí plicní infekci. Plicní aspergilóza se projevuje jako bronchopulmonární alergická aspergilóza, invazivní plicní aspergilóza a jako aspergilom-mycetom <sup>2</sup>.

### 2.3.3. Kryptokokóza

Kryptokoky patří jako předchozí patogenní houby mezi oportunní saprofyty, vyskytující se přirozeně v prostředí. Morfologicky se jedná o kvasinky. Nejčastěji je jako zdroj infekce popisován holubí trus. Blastospory mohou v trusu přežít řadu dnů (až 420), důvodem je přítomnost nízkomolekulárních dusíkatých sloučenin (močovina, kyselina močová, kreatinin) a rezistence k vyschnutí. Dále lze kryptokoky nalézt v mléce a ovocných šťávách <sup>2, 11, 13</sup>.

Původcem onemocnění je nejčastěji *Cryptococcus neoformans*, přičemž rozeznáváme čtyři sérotypy A, B, C a D. Ojedíněle se vyskytuje infekce způsobená *C. albidus*. Podobně jako u aspergilózy dochází i zde k nákaze inhalací. Opouzdřené buňky kryptokoka jsou obvykle příliš velké pro průnik až do alveolů. V plicích pak spóry perzistují jako latentní infekce, nebo přímo vyvolávají pneumonii. Z plic se onemocnění může hematogenní diseminací rozšířit na celou řadu orgánů (především do CNS) <sup>2, 11, 13</sup>.



#### 2.3.4. Mukormykóza

Mukormykóza je akutní a často fatální infekce způsobená ubikvitárními saprofytickými plísněmi řádu *Mucorales* z třídy *Zygomycetes*. V novém taxonomickém systému se většina zygomycet vyvolávajících infekce u imunokompromitovaných pacientů řadí do podkmenu *Mucormycotina*<sup>14, 15</sup>. Tyto plísně se vyskytují volně v přírodě zejména v půdě a na tlejících rostlinách, případně živočišných zbytcích, lze je nalézt i v klimatizacích. Mukory vytvářejí typické neseptované hyfy, které se větví v úhlu téměř 90 stupňů a vytváří v tkáni velmi bohaté mycelium. Z hlavic sporangioforů se do vzduchu může dostat velké množství spor. Proto je nejčastějším zdrojem infekce inhalace spor, které se uchycují na nosní sliznici nebo díky své malé velikosti pronikají do dýchacích cest až do alveolů. Méně často dochází k infekci požitím a následnou kolonizací GIT či přímou infekcí na poraněné kůži. Spory ve tkáních klíčí a vytvářejí vláknité shluky smíšené s fibrinem, které mohou působit v cévách trombózy a lokální infarkty s nekrózou okolní tkáně<sup>2, 11, 13</sup>.

Onemocnění u člověka vyvolávají nejčastěji rody *Mucor*, *Lichheimia* (dříve *Absidia*), *Mycocladius*, *Rhizomucor* a *Rhizopus*. Incidence mukormykózy se pohybuje mezi 5–15% a postižení jsou především imunosuprimovaní nemocní. V dnešní době jsou to především nemocní s krevními chorobami (leukemie a lymfomy) a po transplantaci orgánů, dále pak narkomani. Dříve byl výskyt spojen hlavně s diabetickou ketoacidózou, ulcerózní kolitidou a jaterní cirhózou, tedy se stavy malnutrice, těžkým katabolismem a acidózou. V séru pacienta s ketoacidózou chybí totiž inhibiční aktivita proti růstu hub z řádu *Mucorales*<sup>11</sup>.

#### 2.3.5. Vzácné mykózy

Pro vážně nemocné pacienty se sníženou obranyschopností mohou být patogenní i druhy kvasinek a plísní, které jsou pro zdravé lidi neinfekční. Patří sem saprofytické druhy žijící v půdě i vodě, kolonizující rostliny, zvířata i budovy. Pro tyto nemocné mohou být dále patogenní i organismy normálně způsobující jen dermatomykózy, ale u nich se mohou šířit buď při zranění, nebo při invazivních zákrocích, či katetrizaci. Infekce jimi způsobené mají vysokou úmrtnost, jednak kvůli závažnosti prvotní choroby, kterou komplikují, tak kvůli časté rezistenci na používaná antimykotika. Vzácnější patogenní kvasinky a plísně způsobují kožní a slizniční infekce, ale i závažnější endokarditidy, meningitidy, pneumonie, endoftalmitidy, CNS abscesy, osteomyelitidy i fungemie. K méně obvyklým mykopatogenům patří např. *Trichosporon inkin*, *T.beigelii*, *Blastoschizomyces capitatus*,

*Malassezia furfur*, *Coccidioides immitis*, *Fusarium solanii*, *Scedosporium apiospermum* (neboli *Pseudoallescheria boydi*), *S.inflatum*, *Bipolaris spicifera*, *B.australiensis*, *Acremonium strictum*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Scytalidium dimidatum*, *Paecilomyces varioti*, *P.lilacinus*, *Sporotrichum schenckii*, *Exserohilumrostratum*, *Scopularopsis brevicaulis*, *S.brumpti*<sup>9, 10, 11, 16, 17</sup>.

### 3. Antimykotika

Historie látek specificky působících na houbové organismy není dlouhá. V minulosti se používaly pouze nesespecificky působící látky, např. lihový roztok jodu, peroxid vodíku, manganistan draselný, fenoly, organické kyseliny (undecylenová), kvartérní amoniové soli a trifenylmethanová barviva (gencianová violet'). Zmiňované látky působí desinfekčně a mají exfoliativní účinek (odlupování svrchní části pokožky). Z toho plyne, že se používala pouze na léčbu povrchových a slizničních mykóz. Přibližně před šedesáti lety započal výzkum léčiv se specifickým antifungálním účinkem. Mezi nejstarší látky patří polyenová antimykotika, ale i přes další výzkum se skupina antimykotik významně nerozrostla. Jednou z možných příčin může být hledání cílové struktury účinku antimykotik, které je značně obtížné vzhledem k tomu, že houby jsou eukaryotní organismy. Buňka hub se více podobá savčí buňce než je tomu u bakterie, proto látky hubící houby často poškozují i člověka<sup>11,12,18</sup>.

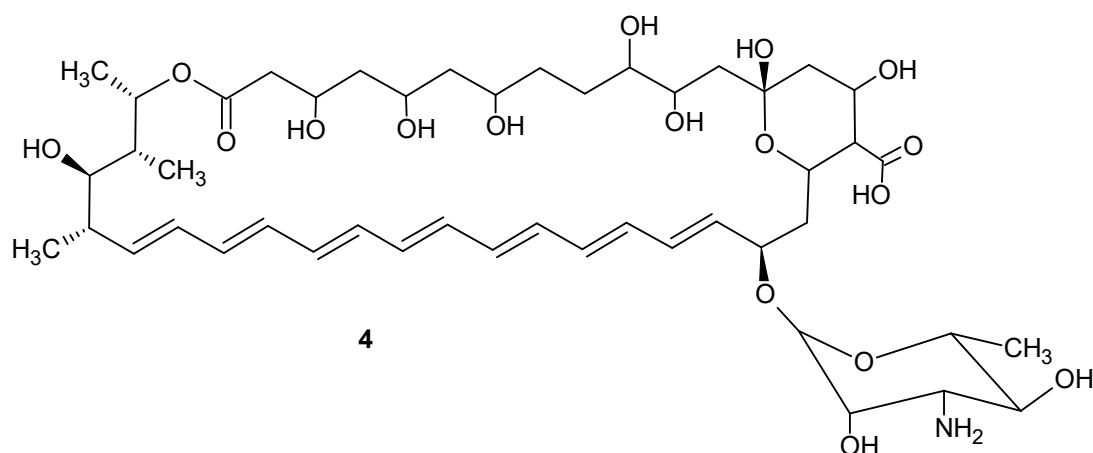
Dle původu můžeme antimykotika rozdělit na přírodní (antimykotická antibiotika), např. polyenová antimykotika, griseofulvin, syntetická, např. azoly, allylaminové deriváty, flucytosin, a polosyntetické látky např. echinokandidy<sup>18</sup>.

Problémem je také, že většina antimykotik se může použít pouze lokálně a jen malý počet se klinicky používá k systémovému podání. K systémovému podání se používají jak látky ze skupiny polyenů (amfotericin B), azoly (flukonazol, itrakonazol, posakonazol, vorikonazol), přičemž ostatní látky z těchto skupin slouží pro lokální terapii. Stále je potřeba vyvíjet nové látky pro systémové použití, protože ty stávající mají řadu nevýhod. Amfotericin B má vysokou toxicitu a z azolů jen některé látky vykazují fungicidní účinek *in vitro*. *In vivo* jsou však pouze fungistaticky účinné. Vorikonazol působí fungicidně proti *Aspergillus* spp a je lékem volby v terapii aspergilózy. Jedny z nejnovějších látek používaných pouze pro systémové podání jsou echinokandidy<sup>2,18</sup>.

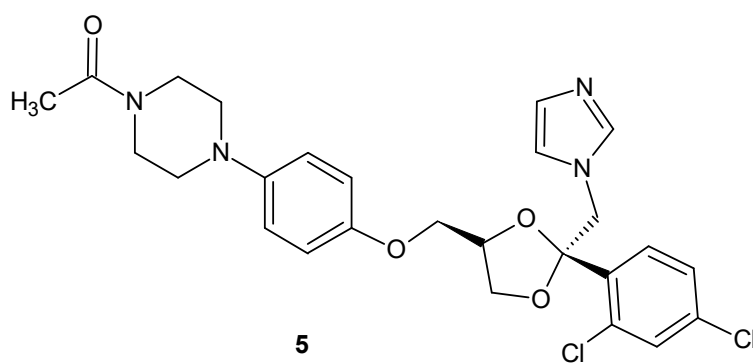
Antimykotika se vyznačují různými mechanismy účinku. První látky s prokázanou antifungální účinností, polyenová antimykotika, se váží na ergosterol plazmatické membrány buněk hub, čímž narušují její strukturu a vedou až ke smrti buňky. Azoly, allylaminové a morfolinové deriváty a thiokarbamáty působí uvnitř buňky na enzymy účastnící se biosyntézy ergosterolu. Vznikají tak jiné steroly a funkce plazmatické membrány je narušena. Ergosterol se nevyskytuje v lidských buňkách, proto je účinek výše

zmíněných látek zacílen na buňky kvasinek a plísni. Ovšem podobnost s cholesterolem lidských buněk existuje, což je příčinou nežádoucích účinků a toxicity léčiv. Specifičtější místem pro zásah antimykotik je buněčná stěna hub, protože tou lidské buňky neoplývají. Látky narušující buněčnou stěnu jsou echinokandidy (kaspofungin), pneumokandidy a nikkomyliny. Echinokandidy nekompetitivně inhibují syntézu  $\beta$ -(1,3)-glukanů, které tvoří hlavní část buněčné stěny hub. Výsledkem je osmotická nestabilita a lýza buňky. Další možností je účinek na úrovni buněčného jádra. Sem spadá griseofulvin působící jako mitotický jed. Antimykotický účinek má také flucytosin, který se v buňce metabolizuje na fluorouracil, který působí jako falešný metabolit a narušuje tak proteosyntézu. Jiný mechanismus účinku má ciklopirox, který inhibuje příjem esenciálních komponent do houbové buňky a při vyšší koncentraci narušuje permeabilitu membrány a má tak fungistatický až fungicidní efekt<sup>2, 11, 18</sup>.

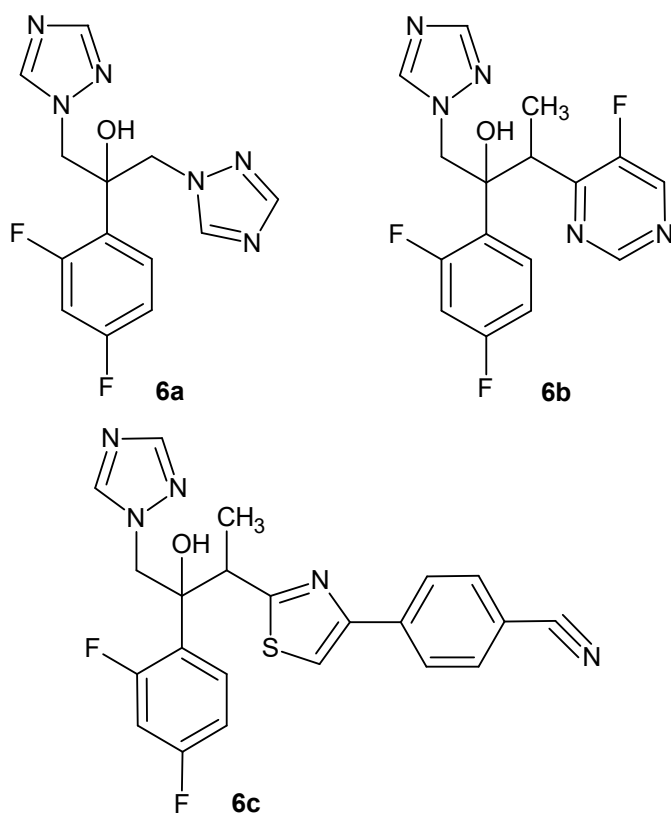
**Amfotericin B (4)** patří mezi polyenová antimykotika. Pro jeho strukturu je typický sedmičlenný lipofilní rigidní polyenový řetězec, který je součástí makrolidového kruhu, jehož druhou část tvoří hydrofilní polyhydroxylovaný řetězec. Na hydrofilní část je navíc glykosidicky navázaný aminocukr (mykosamin) a volná karboxylová skupina. Per os se nevstřebává, proto je nutné parenterální podání. Další nevýhoda amfotericinu B je nefrotoxicita. Proto byly vyvinuty lipidové formy amfotericinu B, které umožňují vyšší dávkování a delší dobu podávání díky snížení nefrotoxicity 4–5krát. Jedná se buď o amfotericin B lipidový komplex, kde je amfotericin B navázaný na dva fosfolipidy, nebo koloidní disperze amfotericinu B a natrium-cholesteryl-sulfátu. Amfotericin B má široké spektrum účinku na řadu plísni a kvasinek (*C.albicans* i non-*albicans*, *C.neoformans*, *Aspergillus* spp., *Coccidioides immitis*, *Sporotrichum schenckii*, *Mucor* spp. atd.). Působí i na některá protozoa. Existují i resistantní kmeny *Candida tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C. lusitaniae* a *Pseudoallescheria boydii*<sup>2, 9, 11, 12, 18</sup>.



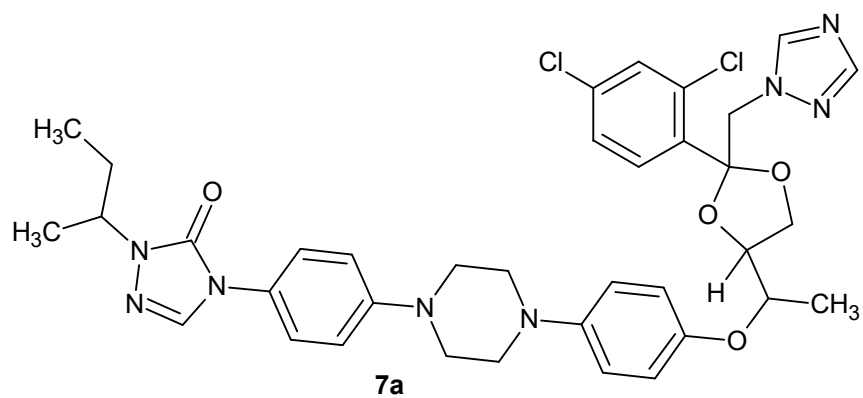
Syntetická azolová antimykotika se dle struktury dělí na imidazolová a triazolová. Starší jsou imidazolová antimykotika, z nichž se do praxe jako systémově užívaná látka dostal jen **ketokonazol (5)**. Od roku 2013 se ketokonazol pro léčbu systémových mykóz nepoužívá<sup>19</sup>. Jako inhibitor steroidogeneze nachází uplatnění v léčbě Cushingova syndromu<sup>20</sup>. Spektrum antimykotického účinku ketokonazolu zahrnuje především kvasinky (kandidy), dermatofyty a dimorfní houby<sup>2,11</sup>.

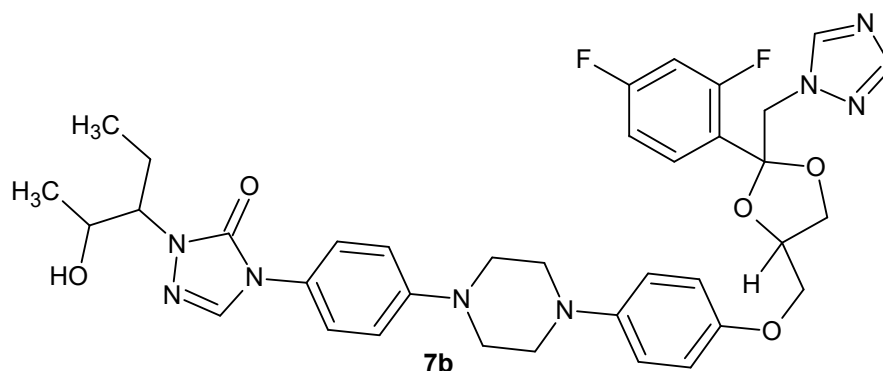


Triazolová antimykotika liší od imidazolových záměnou heterocyklického kruhu jedním nebo dvěma triazoly. Některá mají zvýšenou lipofilitu substitucí aromatických jader chlorem (itrakonazol), jiné atomy fluoru (flukonazol, vorikonazol, ravukonazol, posakonazol). **Flukonazol (6a)** má poměrně malou molekulu, která je snadno rozpustná ve vodě. **Vorikonazol (6b)** a **ravukonazol (6c)** jsou odvozeny od flukonazolu, ale mají na základ navázané větší lipofilnější struktury.

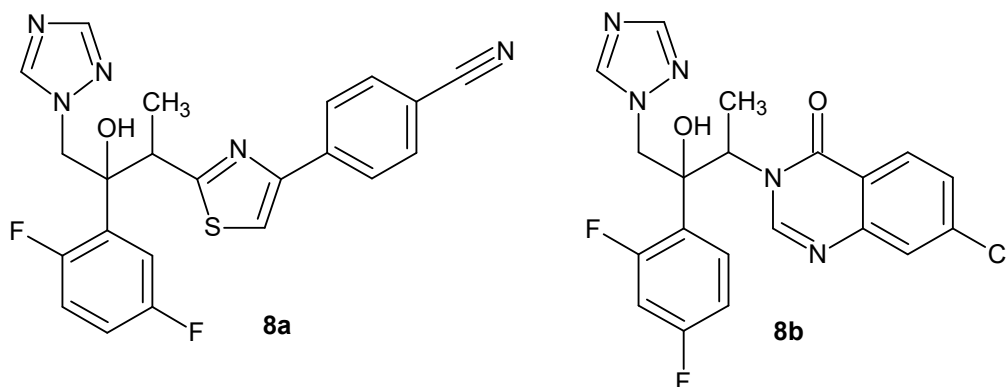


**Itrakonazol (7a)** je velice objemná a značně lipofilní molekula, prakticky nerozpustná ve vodě. Obdobnou strukturu má **posakonazol (7b)**.





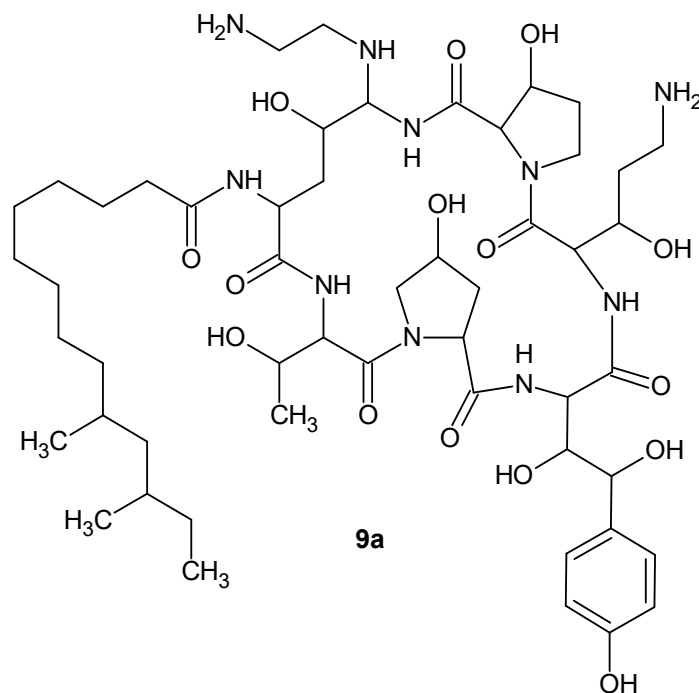
Mezi nejnovějšími studovanými antimykotiky jsou i tři azoly: již zmiňovaný **ravukonazol (6c)** – studovaný nejen jako potenciální antimykotikum<sup>21</sup>, ale také pro léčbu Chagasovy nemoci<sup>22</sup>, dále **isavukonazol (8a)** – schválený k používání v roce 2015 ve formě sulfátu jako přípravek CRESEMBA<sup>23, 24</sup> a **albakonazol (8b)** – dosud v klinických studiích<sup>25</sup>. Nové triazoly jsou chirální látky a používají se jejich enantiomery<sup>11,18</sup>.



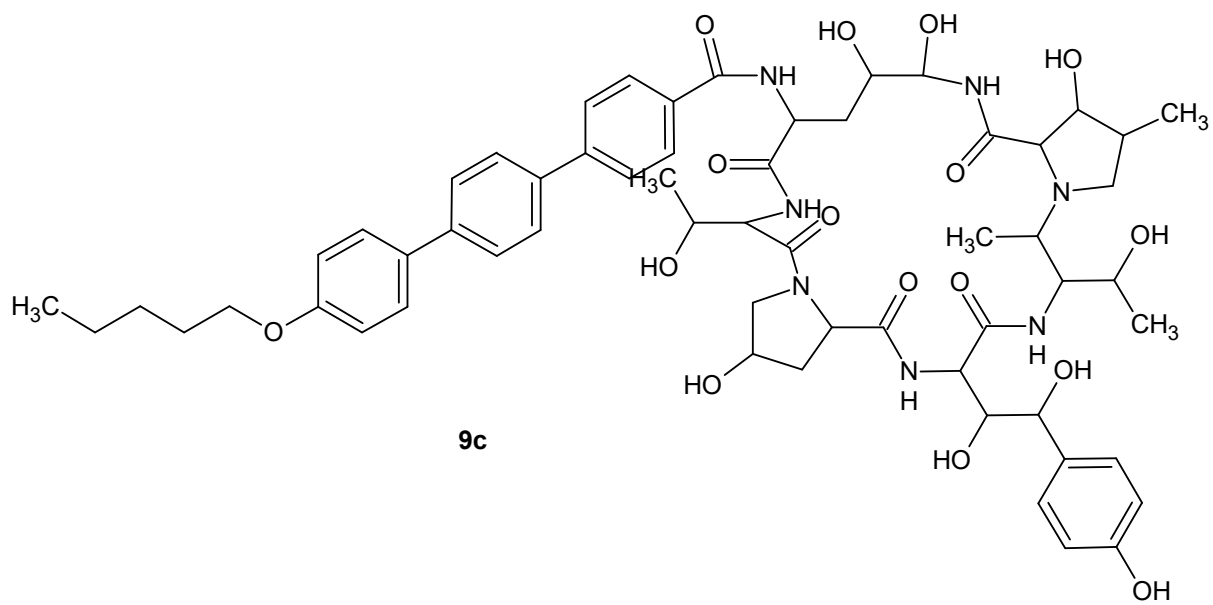
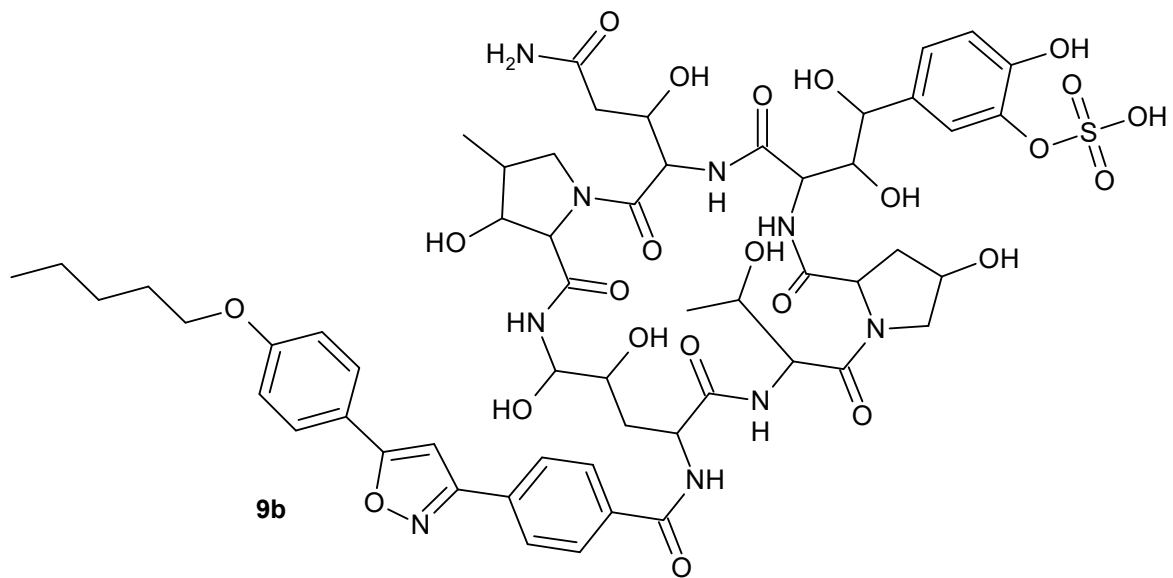
Triazoly mají širší spektrum účinku a vykazují nižší MIC než imidazolová antimykotika. Citlivé jsou kmeny kandid včetně non-albicans kmenů. Přičemž novější látky jsou účinnější a likvidují i kmeny *C.kruzei* a *C.glabrata* rezistentní na flukonazol. Většinou působí vůči kandidám fungistaticky, fungicidní účinek je druhově specifický. Kromě flukonazolu vykazují triazoly dobrou účinnost vůči *Aspergillus* spp. Lékem volby v léčbě aspergilózy je vorikonazol, který působí fungicidně. Někdy se používají i itrakonazol a posakonazol, který je účinnější při léčbě invazivních aspergilóz u pacientů s neutropenií. Ve studiích vykazovaly nové látky (především isavukonazol) lepší účinnost proti kmenům

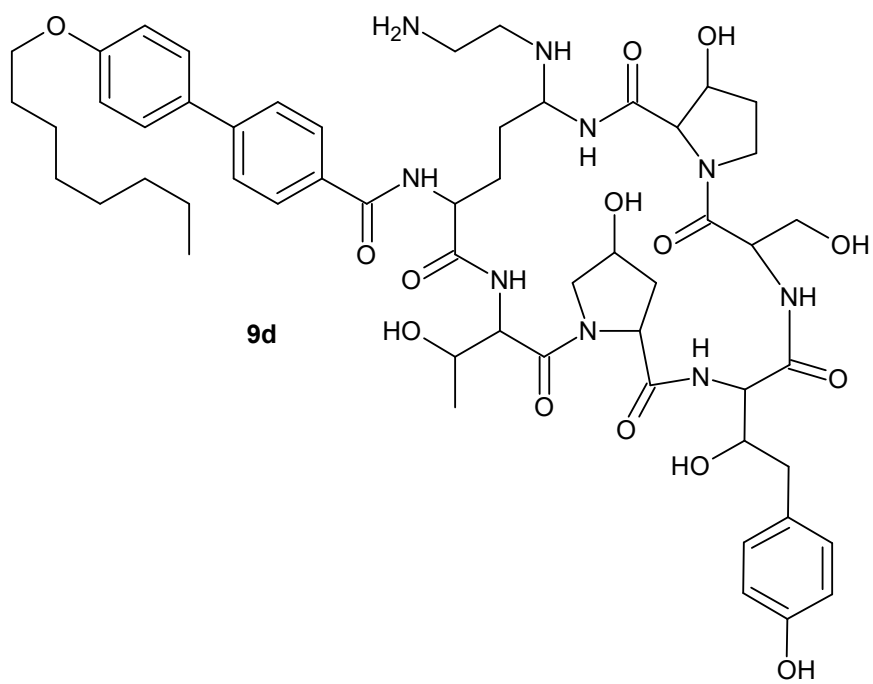
aspergilů, včetně rezistentních na itraconazol. Vysokou citlivost vykazují i *Cryptococcus* spp., výbornou účinnost i proti kmenům rezistentním na flukonazol mají nové azoly (posakonazol, ravukonazol, albakonazol). Všechny látky inhibují růst dermatofytů. Posakonazol i isavukonazol mají výbornou aktivitu vůči třídě *Zygomycetes*. Spektrum azolů zahrnuje také *Coccidioides immitis*, *Penicilium* spp., *Scedosporium*, *Sporotrichum schenckii*, *Fusarium* spp., *Scopularopsis* spp. A další. Citlivost se u jednotlivých látek liší <sup>2, 11, 18, 21, 26</sup>.

Nejnovější skupinou antimykotik využívaných v praxi pro systémovou terapii jsou echinokandidy. Skupina je intenzivně zkoumána od počátku 21.století. Jedná se o semisyntetické látky charakteru lipopeptidů. Konkrétněji je jejich struktura tvořena deriváty mastných kyselin a cyklických hexapeptidů. Do praxe již byly zavedeny **kaspofungin (9a)**, **mikafungin (9b)** a **anidulafungin (9c)**. V prvních fázích klinického výzkumu se nachází **aminokandin (9d)**. Nevýhoda vyplývající ze struktury echinokandidů je nutnost intravenózního podání, které ovšem postačuje jedenkrát denně. Z hlediska spektra účinku patří echinokandidy mezi širokospektrá systémová antimykotika. Využívají se u invazivních aspergilóz a kandidóz, neodpovídajících na léčbu jinými antimykotiky pro systémovou terapii <sup>2, 12, 18, 21</sup>.









## 4. Antifungálně účinné chalkony

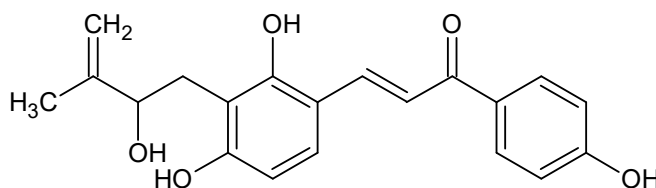
Struktura chalkonů, její možné obměny a jejich využití bylo popsáno v úvodu. Dále se budu věnovat mechanismu antifungálního účinku chalkonů, uvedu příklady přirozeně se vyskytujících chalkonů s antifungálním účinkem i těch získaných synteticky obměnou základní struktury.

### 4.1. Mechanismus antifungálního účinku chalkonů

Jak přesně chalkony působí proti mykózám, není dosud jednoznačně prokázáno. Zřejmě nepůsobí stejným mechanismem jako amfotericin B, tedy tvorbou pórů v buněčné stěně hub<sup>27</sup>, není však vyloučeno, že narušují buněčnou stěnu jiným způsobem<sup>1, 3, 5, 7</sup>.

Protože při změně základního uspořádání  $\alpha,\beta$ -nenasyceného ketonu dochází ke snížení až ztrátě účinku, lze vyvozovat, že tato struktura je pro účinek podstatná. Důležitou vlastností  $\alpha,\beta$ -nenasyceného ketonu je možnost vázat thiolové a amino skupiny enzymů, což může být hlavní příčina inhibice syntézy buněčné stěny kvasinek a hub<sup>28</sup>. Již bylo prokázáno, že chalkony mohou způsobovat inhibici biosyntézy důležitých součástí buněčné stěny hub, jako jsou  $\beta$ -(1,3)glukan a chitin<sup>29</sup>. Následkem toho dochází k znemožnění transformace kvasinek na vláknitou formu, zodpovědnou za patogenitu kvasinek. Dalším následkem je narušení i dalších membránových funkcí<sup>30</sup>.

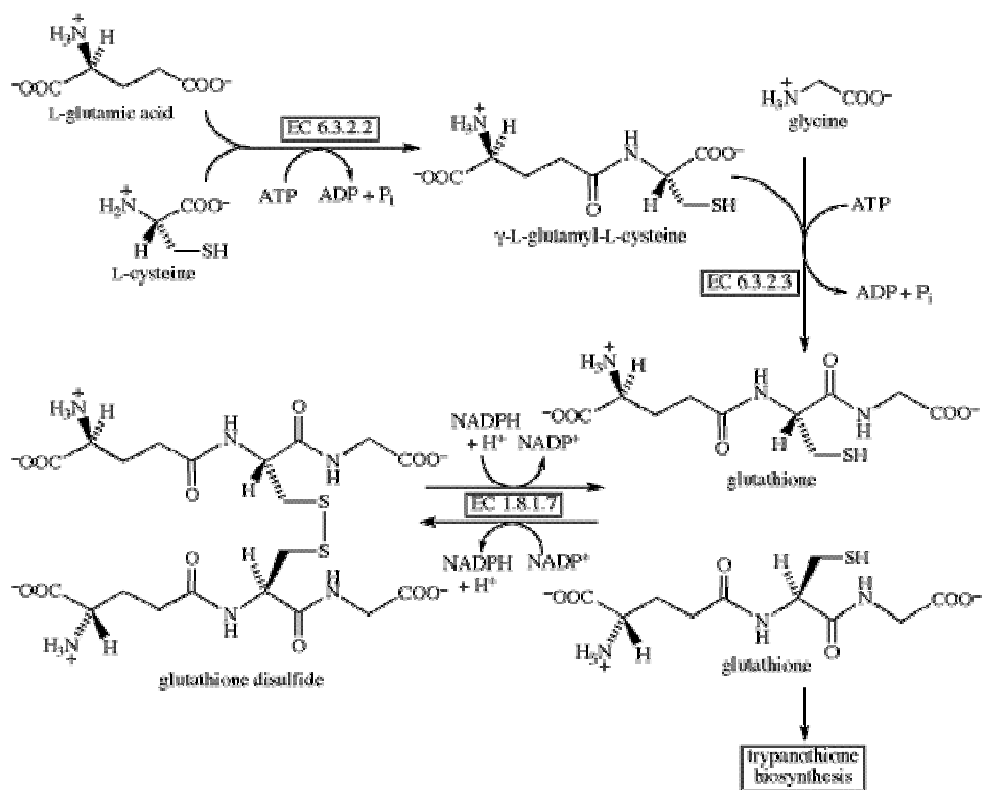
Studie z poslední doby naznačují, že chalkony mohou ovlivňovat také expresi genů. Studie provedená v roce 2008 na třech druzích kvasinek sice ukázala, že DNA není hlavním cílem působení chalkonů<sup>31</sup>, ale v novějších studiích bylo prokázáno, že *trans*-chalkon (**1**) potlačuje geny *FAS1* a *ERG6* dermatofytu *Trichophyton rubrum*. Proteiny kódované těmito geny jsou nutné pro syntézu mastných kyselin a ergosterolu<sup>32</sup>. Bylo též zjištěno, že některé flavonoidy, včetně chalkonu **10**, inhibují syntézu mastných kyselin (FAS) z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ale jejich inhibiční účinnost nekorelovala s jejich antifungální aktivitou proti *C. albicans* a *Cryptococcus neoformans*<sup>33</sup>.



**10**

V další studii<sup>34</sup> byl sledován vliv *trans*-chalkonu na geny *T. rubrum* kultivovaného v přítomnosti keratinocytů. Bylo zjištěno, že *trans*-chalkon snižoval expresi genů nutných pro glyoxylátový cyklus, isocitrátlyasu a citrát syntasu, genů potřebných pro syntézu ergosterolu (*ERG1* and *ERG11*), genu kódujícího serinovou proteasu (subtilisin) a metaloproteinasu 4. Snižena byla také exprese genu *TruMDR2*, který kóduje *ATP-binding cassette* (ABC) transportéru modulujícího citlivost *T. rubrum* vůči antimykotikům<sup>35</sup>.

Důležitou roli v účinku chalkonů hraje glutathion a enzymy podílející se na jeho syntéze, oxidaci/redukci a jeho konjugaci s endo- a xenobiotiky<sup>36</sup>. Metabolismus glutathionu je znázorněn ve Schématu 1<sup>37</sup>. První krok syntézy je katalyzován glutamát-cysteinligasou (EC 6.3.2.2)<sup>38</sup>, druhý krok glutathion syntasou (EC 6.3.2.3)<sup>39</sup>. Oxidace glutathionu na disulfid a jeho zpětná redukce probíhá za účasti glutathion-disulfidreduktasy (EC 1.8.1.7)<sup>40</sup>. Pro konjugaci redukovaného glutathionu s různými sloučeninami jsou potřebné glutathion-S-transferasy (EC 2.5.1.18)<sup>41</sup>, jichž je známo velké množství<sup>42,43,44, 45</sup>.

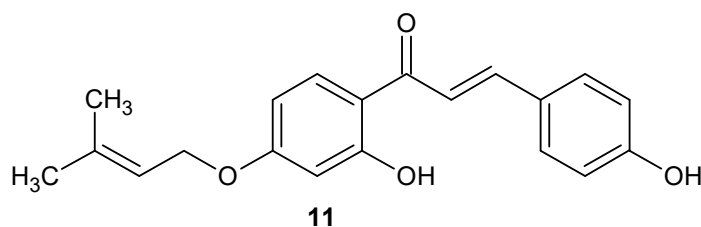


**Schéma 1. Metabolismus glutathionu**

(převzato z <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/AminoAcid/glutathi.html><sup>37</sup>)

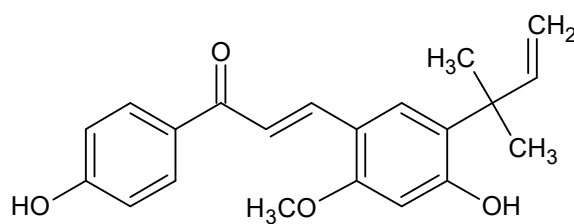
Batovská a kol.<sup>31, 36</sup> uvádějí, že detoxikace chalkonů spočívá alespoň částečně v reakci s thiolovými skupinami a mutanty kvasinky *Hansenula polymorphase* sníženou zásobou látek obsahujících SH-skupiny (mutacemi genů *GSH1*, *GSH2* and *CYS1*) vykazují zvýšenou citlivost vůči chalkonům. Nejvyšší senzitivita byla zjištěna u kmene s chybějícím genem *GSH2*. Glutathion je tedy nejdůležitějším thiolem pro detoxikaci chalkonů<sup>31</sup>.

Chalkony mohou různými mechanismy zvyšovat obsah glutathionu<sup>46, 47</sup>, inhibovat glutathionreduktasu<sup>48, 49</sup>, inhibovat glutathion-S-transferasu<sup>50, 51</sup>, ale také indukovat její tvorbu<sup>52, 53, 54</sup> a ovlivňovat transport glutathionu a glutathion-S-konjugátů z buněk<sup>55, 56</sup>. Těmito mechanismy chalkony moduluji své vlastní účinky i účinky dalších látek, vykazují antioxidační, cytoprotektivní a chemoprotektivní účinky<sup>57, 58, 59, 60, 61, 62</sup> nebo naopak zcitlivují rezistenční mikroorganismy a nádorové buňky vůči léčivům<sup>63, 64, 65, 66, 67, 68</sup>. Gales se spolupracovníky<sup>69</sup> studovali metabolismus glutathionu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* rostoucích ve formě biofilmu a zjistili, že obsah redukovaného glutathionu je závislý na růstové fázi a hraje důležitou roli v odolnosti kvasinek vůči oxidačnímu stresu. Biofilm je perzistující forma mikroorganismů, která je díky vmezeření do extracelulární matrix méně dostupná pro imunitní systém hostitele i případná léčiva. Tvorba mikrobiálních biofilmů (bakteriálních, fungálních nebo smíšených) je jedním z faktorů významně komplikujících úspěšnou léčbu chorob mikrobiálního původu<sup>70, 71</sup>. Schopnost narušovat tvorbu biofilmů byla prokázána u některých flavonoidů<sup>72, 73, 74</sup> včetně chalkonů<sup>75</sup>. Ve studii věnované účinku přírodního isopentenylloxychalkonu 4-hydroxykordoinu (**11**) na přeměnu kvasinek na vláknitou formu a též na jejich schopnost tvořit biofilm nebyly prokázány účinky 4-hydroxycordoinu na růst *C.albicans*, ale byla pozorována inhibice tvorby biofilmu a přeměny kvasinek na hyfy, což snižuje virulentní vlastnosti kandid<sup>76</sup>.



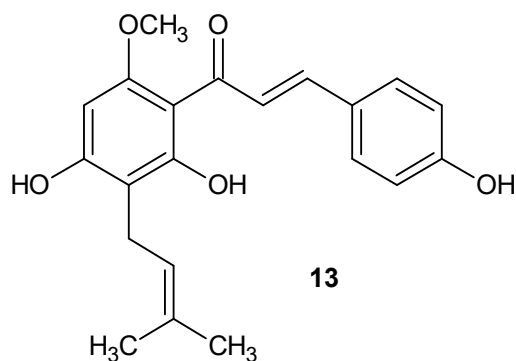
## 4.2. Přírodní chalkony s antifungálním účinkem

V lidovém léčitelství je používána řada rostlin s obsahem chalkonů. Velmi známá je například lékořice (*Glycyrrhiza glabra*, Fabaceae), která je v čínském lidovém léčitelství používána k léčbě žaludečních a duodenálních vředů, astma bronchiale, ekzémů, otrav jídlem i některých parazitických infekcí. Kromě chalkonů obsahuje i kumariny, saponiny a flavonoidy. Bližším studiem účinku látek izolovaných z kořene lékořice se zabývali C. Messier a D. Grenier. Licochalkon A (**12**) prokázal antifungální účinnost proti *C. albicans*. Navíc inhiboval tvorbu biofilmu i přeměnu na hyfy u testovaných kmenů kandid. Tito autoři se též zaměřili na synergické působení licochalkonu A s nystatinem, které potvrdili. Tyto poznatky jsou velmi slibné a mohou vést k menším dávkám nystatinu nutných k účinku a k snížení jeho toxického vlivu na lidský organismus<sup>77</sup>.



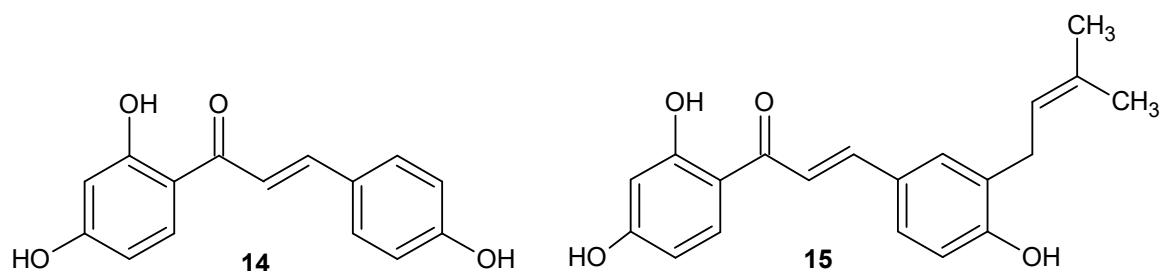
**12**

Další velmi dobře známou rostlinou obsahující chalkony je chmel (*Humulus lupulus*, Cannabinaceae). Ve variantách chmele rostoucího v severní Americe a východní Asii se vyskytuje prenylchalkon xanthohumol (**13**). Jeho antifungálními účinky se zabývali italští autoři. Prokázali účinnost xanthohumolu proti *Trichophyton* spp., ale proti *C. albicans* i proti ostatním testovaným lidským patogenům byl neúčinný<sup>78</sup>.



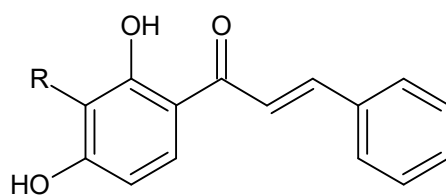
**13**

Kuate a kol. izolovali z tropické rostliny *Treculia obovoidea* (Moraceae) flavonoidy, o nichž předpokládali, že jsou zodpovědné za antifungální účinek extraktu *T.obovoidea*. Mezi získanými látkami byl 4,2',4'-trihydroxychalkon (**14**) a 4,2',4'-trihydroxy-3-prenylchalkon (**15**). Obě látky prokázaly antifungální účinnost proti *C.glabrata* a *C.krusei*. Neprenylovaný chalkon **14** byl účinný i proti *C.albicans*<sup>79</sup>.



Z Jižní Ameriky pochází rostlina *Zuccagnia punctata* (Fabaceae). Jejím domovem je Argentina, kde se v lidovém léčitelství používá jako antiseptikum. Je velice zajímavá svými antibakteriálními a antifungálními účinky. Methanolvý extrakt z této rostliny byl účinný proti patogenním houbám napadajícím sóju. Látky izolované z plodů a nadzemních částí jsou neméně zajímavé, jedná se o flavanony, flavony, chalkony a estery kyseliny kávové<sup>80</sup>.

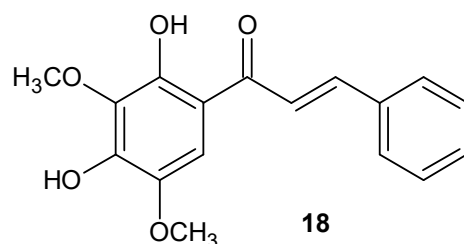
V další studii<sup>27</sup> byly zkoumány petroletherový a dichlormethanový extrakt z plodů, nadzemní části a exsudátu této rostliny a látek v nich obsažených na nejčastější houbové patogeny imunodeficitních pacientů (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* a *A.niger*), dále byla hodnocena účinnost proti dermatofytům (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* a *T.rubrum*), které jsou nejčastější příčinou mykóz ve vyspělých zemích. Z dichlormethanového extraktu exsudátu byly izolovány potenciálně účinné látky. Z testů vyšly dva chalkony s antifungálními účinky. 2',4'-dihydroxy-3'-methoxychalkon (**16**) silně účinkoval proti *M.gypseum*, *T.mentagrophytes* a *T.rubrum*. 2',4'-dihydroxychalkon (**17**) oplýval širokým spektrem aktivity od inhibice *C.albicans* přes inhibici *C.neoformans* až po účinek na dermatofyty.



**16:** R = OCH<sub>3</sub>

**17:** R = H

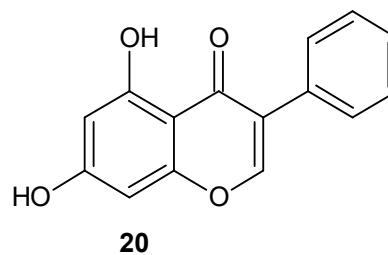
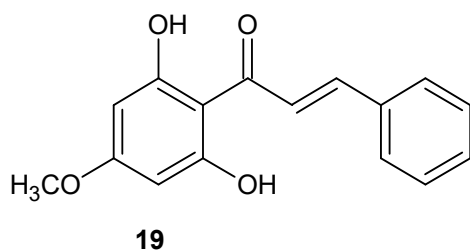
Další rostlina Jižní Ameriky *Polygonum spectabile* (Polygonaceae) obsahuje velmi podobné látky jako *Z.punctata*. V Brazílii je používána v lidovém léčitelství proti průjmům, vředové chorobě, zánětům dásní, revmatismu i kožním chorobám. Brandão se spolupracovníky testovali účinnost extraktu nadzemních částí *P. spectabile* proti původcům mykóz kůže zvířat i lidí. Extrakt vykazoval dobrou účinnost proti *Microsporum canis*, *T. mentagrophytes* a *T.rubrum*. Jako látka účinná proti dermatofytům byl označen 2',4'-dihydroxy-3',6'-dimethoxychalkon (**18**). Což dokládá opodstatnění používání *P. spectabile* na léčbu kožních nemocí <sup>81</sup>.



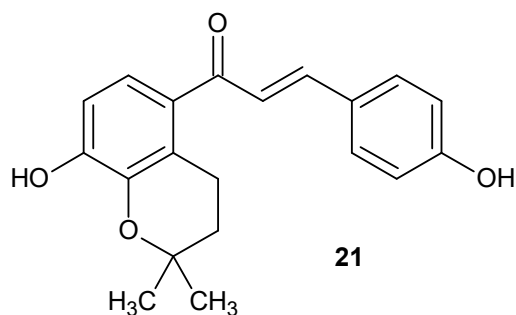
**18**

Chalkony obsahuje i kůra stonku rostliny *Uvaria scheffleri* (Annonaceae). V Tanzánii je používána k léčbě horečky při malárii. Byly potvrzeny antibakteriální, antimalarické a cytotoxické účinky extraktu z kůry i látek v něm obsažených. Dále byly z extraktu izolovány látky s antifungálním účinkem. Jako u předešlých příkladů byly izolovány chalkony se substitucí pouze na kruhu A. Nejlepší aktivitu proti *C. albicans* měla směs 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalkonu (**19**) a 5,7-dihydroxyflavonu (**20**). Směs těchto látek navíc účinkovala i proti *A. niger*, *A.fumigatus* a proti druhu *Penicillium*. Bohužel se nepodařilo látky oddělit, proto nelze s jistotou říct, která je za účinek zodpovědná <sup>82</sup>.

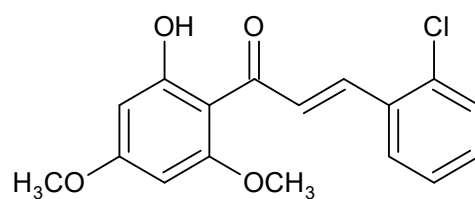




Krotmadin (**21**) je další látka přírodního původu účinná proti dermatofytům. Byl izolován z listů a stonku rostliny *Crotalaria madurensis* (Fabaceae) a vykazoval aktivitu proti *T. mentagrophytes*<sup>83, 84</sup>.

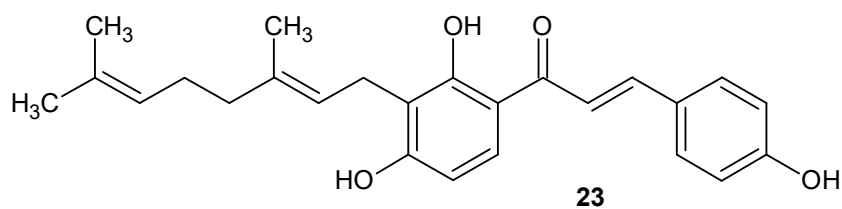


Boeck a kol.<sup>30</sup> se inspirovali pro vývoj antimykoticky aktivních sloučenin bioaktivními látkami z rostliny *Sebastiania schottiana* (Euphorbiaceae). Výchozí látkou byl xanthoxylin (2'-hydroxy-4',6'-dimethoxyacetophenon), který ve své molekule má hydroxyskupinu v poloze 2'. Názory na potřebnost této skupiny pro antifungální účinnost nebyly jednotné. Proto syntetizovali různé chalkony s xanthoxylinem jako základem molekuly. Některé z látek vykazovaly účinek proti dermatofytům. Z výsledků vyplynulo, že 2'-hydroxy skupina je pro účinnost výhodná, ale ne dostačující. Nejvyšší aktivitu proti *T. rubrum* měl 1-(2'-hydroxy-4',6'-dimethoxyfenyl)-3-(2-chlorfenyl)prop-2-en-1-one (**22**). Test na *Neurospora crassa* ukázal, že tento chalkon patrně působí inhibicí buněčné stěny a indukuje malformaci hyf.

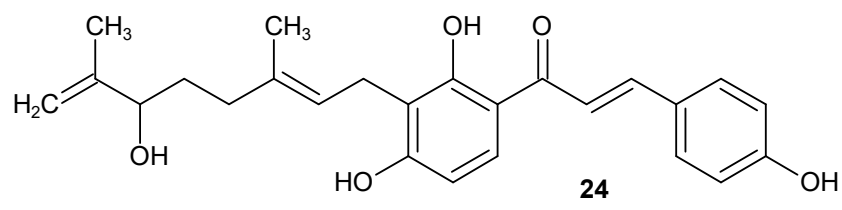


**22**

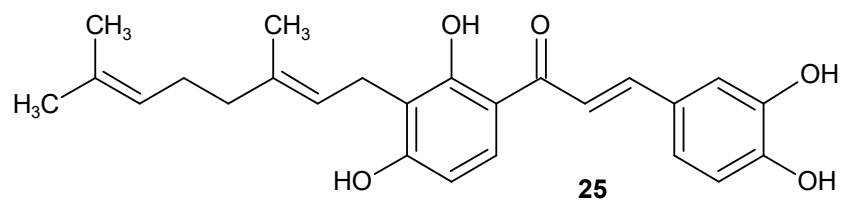
L. Jayasinghe a spolupracovníci se zabývají výzkumem rostlin ze Srí Lanky. Z listů stromu *Artocarpus nobilis* (Moraceae) izolovali geranylchalkony s antifungálními účinky. Byly mezi nimi látky již dříve popsané, jednalo se o xanthoangelol (**23**) a xanthoangelol B (**24**) izolovaný dříve z rostliny *Angelica keiskei* (Apiaceae) a 2',3,4,4'-tetrahydroxy-3'-geranylchalkon (**25**) popsaný dříve v listech *Artocarpus incisus* (Moraceae).



**23**

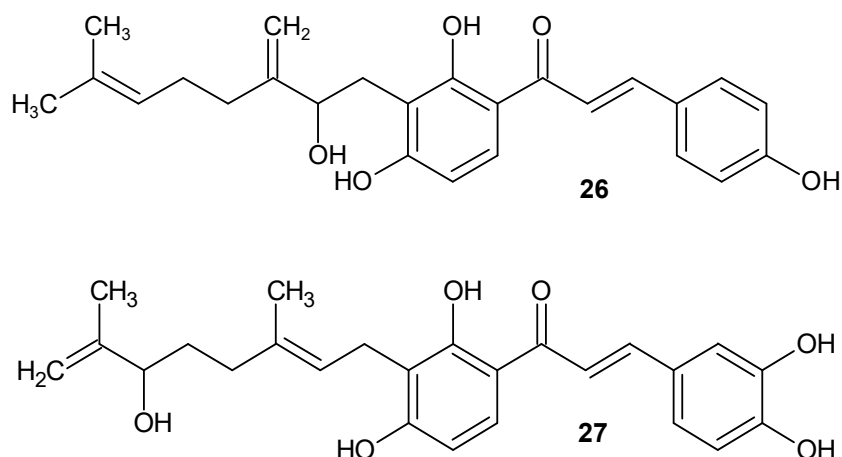


**24**

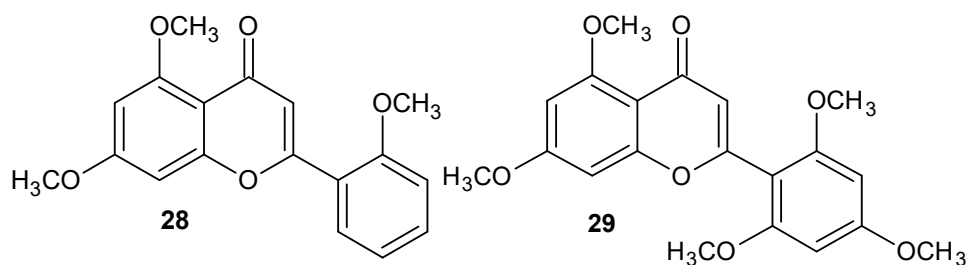


**25**

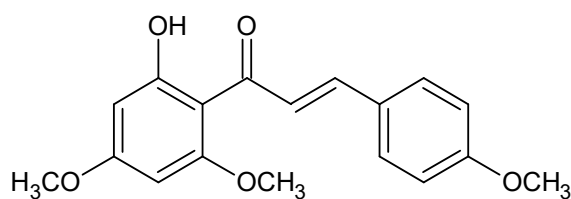
Nově zaznamenané látky byly 2',4,4'-trihydroxy-3'-[2-hydroxy-7-methyl-3-methylen-6-oktaenyl]chalkon (**26**) a 2',3,4,4'-tetrahydroxy-3'-[6-hydroxy-3,7-dimethyl-2(*E*),7-oktadienyl]chalkon (**27**). Všechny látky vykazovaly účinnost proti *Cladosporium cladosporioides*<sup>85</sup>.



*Andrographis viscosula* (Acanthaceae) rostoucí v Jižní Indii a Bangladéši je používána v lidovém léčitelství proti dyspepsii, úplavici, malarii, chřipce a jiným infekcím dýchacích cest. Mostahar a spol. syntetizovali flavonoidy popsané dříve v této rostlině a podrobili je i jejich prekurzory chalkony testům na účinnost proti *A.niger* a *A. fumigatus*. Všechny látky vykazovaly antifungální účinnost. 2',5,7-trimethoxyflavon (**28**) a 2',4',5,6',7-pentamethoxyflavon (**29**)<sup>86</sup> byly účinnější než jim odpovídající chalkony s volnou hydroxyskupinou v poloze 2'.

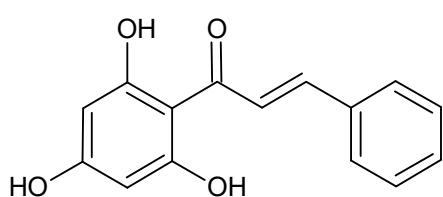


2'-hydroxy-4,4',6'-trimethoxychalkon (**30**) izolovaný z kůry stromu *Pterocarpus marsupium* (Fabaceae) inhiboval klíčení spor hub patogenních pro rostliny, včetně saprofytického *A. flavus*<sup>87</sup>, který může vyvolávat mykózy i u lidí<sup>88,89</sup>.

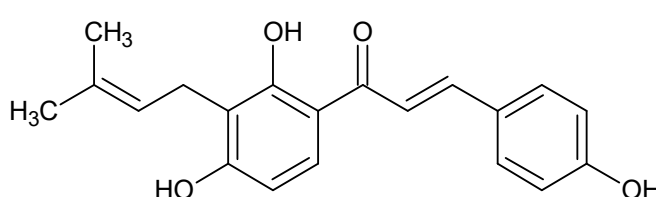


30

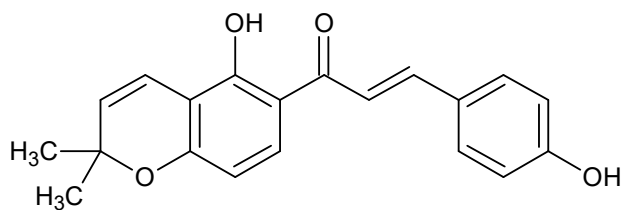
Dalšími přírodními chalkony s antifungálními účinky jsou pinocembrin chalkon (**31**)<sup>90</sup>, isobavachalkon (**32**)<sup>91</sup> a 4-hydroxylonchokarpin (**33**)<sup>92</sup>.



31



32

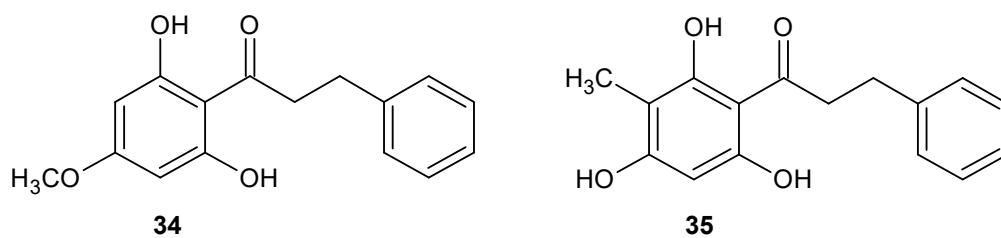


33

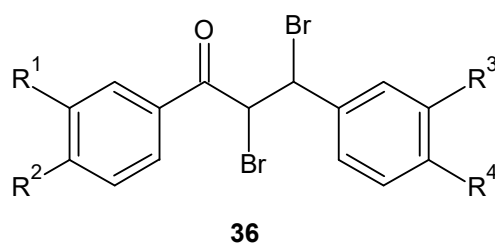
Látky izolované z rostlin se pro své účinky staly vzory pro syntézu sloučenin s obměněnou strukturou.

### 4.3. Syntetické obměny přírodních chalkonů

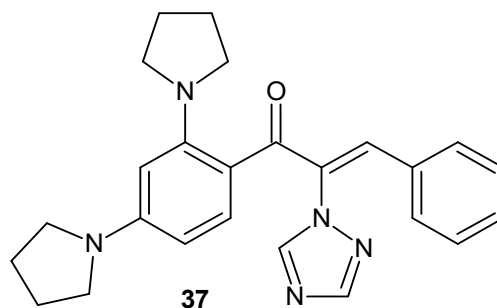
Vzhledem k tomu, že enonové seskupení se zdá být pro antifungální působení chalkonů zásadní<sup>29</sup>, byly obměňovány především substituenty na benzenových jádrech, případně byly připraveny heterocyklické analogy. Nicméně Novakowska ve svém přehledu<sup>4</sup> antifungálně aktivních chalkonů zmiňuje i dihydrochalkony se substitucí pouze na kruhu A. Přestože dihydrochalkony postrádají ve své molekule enonové uspořádání, 2',6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalkon (**34**) vykazoval dobrou účinnost vůči *C. albicans* a *Cryptococcus neoformans* a 2',4',6'-trihydroxy-3'-methyl-dihydrochalkon (**35**) byl aktivní proti *T. mentagrophytes*.



Antifungální aktivita byla popsána také u některých  $\alpha,\beta$ -dibromchalkonů obecného vzorce **36**, kde  $R^1$ – $R^4$  jsou např.  $\text{CH}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{Br}$  <sup>4, 5, 93, 94</sup>.



Zajímavými sloučeninami jsou také  $\alpha$ -triazolyl chalkony z nichž látka **37** měla proti *C. albicans* a *C. mycoderma* účinnost srovnatelnou s flukonazolem <sup>95</sup>.



Také konformační uspořádání molekuly chalkonů může být pro účinek důležité <sup>6, 29</sup>. Pokud jde o vzájemné postavení karbonylové skupiny a dvojné vazby, chalkony s uspořádáním *s-cis* jsou stálejší než odpovídající *s-trans* konformery <sup>6</sup>. Pokud nejsou chalkony substituovány v *ortho*-polohách kruhů A a B zaujímají planárnímu uspořádání <sup>6,29</sup>.

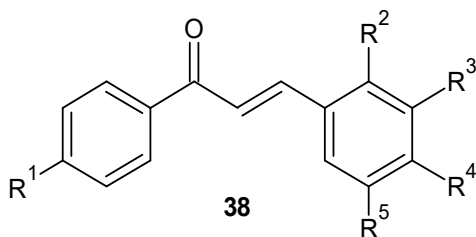
#### 4.3.1. Substituce benzenových jader

Jednu z nejrozsáhlejších studií věnovaných vztahům mezi strukturou a antifungálním účinkem chalkonů publikovali v roce 2001 Lópezová a kol. <sup>29</sup> Testovali celkem 41 chalkonů a jejich analogů a dospěli k těmto závěrům:

- Substituenty na kruhu A mají na antifungální účinnost menší vliv než substituenty na kruhu B <sup>29</sup>. Získané poznatky nedovolují jednoznačné zobecnění. Většina výše uvedených přírodních chalkonů má hydroxylovou skupinu v poloze 2', ale antifungální efekt byl pozorován i u chalkonů bez této skupiny, např. likochalkonu A (**12**) nebo krotmadinu (**21**).
- Na kruhu B nejsou vhodné substituenty s elektron-donorovými vlastnostmi (EDG), např. methoxyskupina <sup>29</sup>.
- Elektrony-odtahující skupiny (EWG), např. NO<sub>2</sub> nebo Cl v *p*-poloze kruhu B účinnost zvyšují. Pokud je však taková skupina v poloze *ortho*, dochází ke snížení účinnosti v důsledku sterických vlivů <sup>29</sup>. Negativní vliv *ortho*-substituce však nebyl potvrzen v další studii provedené stejnou výzkumnou skupinou <sup>30</sup>.

Autoři také uvádějí, že chalkony jsou účinné pouze proti dermatofytům <sup>29, 30</sup>, ale níže uvedené studie to nepotvrzují. Většinu zobecnění poznatků o vztazích mezi strukturou a antifungální aktivitou chalkonů a jejich analogů zásadně brání skutečnost, že každá studie používá jinou metodiku hodnocení antifungální účinnosti. Z toho důvodu v uvedeném přehledu neuvádím konkrétní hodnoty MIC (mikrodiluční metody) nebo inhibičních zón (diskové metody).

Lahtchev a kolegové <sup>31</sup> testovali 21 chalkonů obecného vzorce **38** substituovaných na kruhu B převážně hydroxy a methoxy skupinami na 3 druzích kvasinek. Na rozdíl od výše zmíněných studií <sup>29,30</sup> nepozorovali pozitivní vliv EWG v *para* poloze kruhu B, avšak přítomnost EDG v této poloze vedla k neúčinným sloučeninám. Samotná hydroxyskupina v poloze *meta* měla pozitivní vliv na antifungální účinek. Oproti tomu methoxy skupina v poloze *meta* vedla ke ztrátě aktivity. Výhodná byla současná přítomnost *m*-OH a *p*-OCH<sub>3</sub> skupiny na kruhu B; vzájemná výměna těchto skupin nebo jejich přesun do jiných poloh vedl k neaktivním sloučeninám. U sloučenin s jednou hydroxylovou skupinou na kruhu B bylo výhodné zavedení chlóru do *para*-polohy kruhu A.



$R^1 = \text{H, Cl}$

$R^2 = \text{H, OH}$

$R^3 = \text{H, OH, OCH}_3$

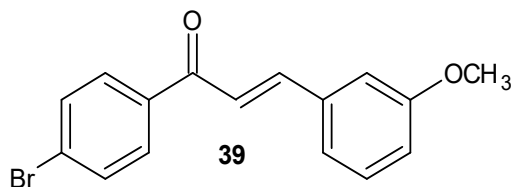
$R^4 = \text{H, OH, OCH}_3, \text{Cl, CN, NO}_2, \text{NH(CO)CH}_3, \text{CH}_3$

$R^5 = \text{H, OCH}_3$

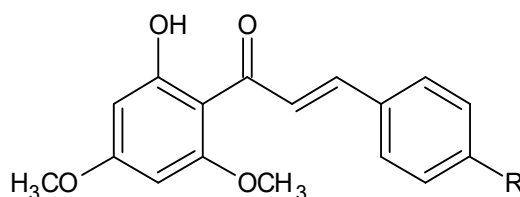
Obdobnými sloučeninami se zabývala Batovska se spolupracovníky<sup>36</sup>. Zkoumali vliv substituce kruhu B na aktivitu proti *C.albicans*. U hydroxylovaných derivátů byla nejvýhodnější *ortho* poloha, následovaly pozice *para* a *meta*. Autoři syntetizovali také 3',4',5'-trimethoxychalkony. Ty byly neaktivní bez ohledu na substituci na kruhu B. Substituce jednou, dvěma nebo třemi methoxy skupinami, případně 3,4-methyldioxy seskupením, na kruhu B nehydroxylovaných chalkonů rovněž vedla k neúčinným sloučeninám.

Řada antimykotik obsahuje ve své molekule halogen. Zavedení atomu fluoru, chloru či bromu do struktury chalkonu by mělo zvýšit jeho biologickou dostupnost i aktivitu. Zvyšuje se oxidativní i tepelná stabilita, molekuly se stávají hůře metabolicky rozložitelné. Samozřejmě též narůstá rozpustnost v tucích, čímž se zvyšuje rychlost absorpce a transport léčiva v těle. Halogeny na rozdíl od předchozích substituentů (OH, OCH<sub>3</sub>) patří k EWG a zvyšují nukleofitu β-uhlíku enonového seskupení. Ten je považován za hlavní centrum reakcí s elektrofilními skupinami (NH<sub>2</sub>, SH) biologických systémů<sup>96,97</sup>. Kromě výše uvedených chlorovaných derivátů lze v literatuře nalézt i další příklady halogenovaných chalkonů.

V přehledu Nowakowské<sup>4</sup> je uveden jako silně antifungálně účinný 4'-brom-3-methoxychalkon (**39**), který vykázal aktivitu proti *Microsporium canis*, *M.gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* a *T.rubrum*.



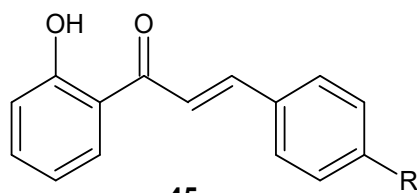
Také chalkony odvozené od xanthoxylinu<sup>30</sup> vykazovaly zvýšený účinek proti dermatofytům, byl-li kruh B substituován halogenem. Nejvyšší aktivitu proti *T. rubrum* měl *ortho*-substituovaný 1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyfenyl)-3-(2-chlorfenyl)prop-2-en-1-on (**22**). Vyšší účinnost ve srovnání s nehalogenovaným 1-(2-hydroxy-4,6-dimethoxyfenyl)-3-fenylprop-2-en-1-onem (**40**) měly také *para*-substituované deriváty (**41–44**). EWG v *meta*-poloze účinek zvyšovala pouze mírně.



**40:** R = H; **41:** R = F; **42:** R = Cl; **43:** R = Br; **44:** R = NO<sub>2</sub>

Hasan a spol.<sup>96</sup> syntetizovali mono- a dihalogenované 2'-hydroxychalkony a od nich odvozené flavonoly. Většina testovaných sloučenin vykazovala vysokou aktivitu proti *Trichophyton longifusus* a *Microsporium canis*, ale nízkou aktivitu proti kandidám a *Fusarium solani*.

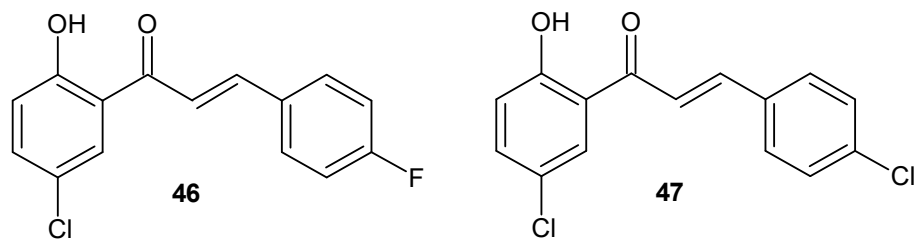
Aktivita proti *T. longifusus* byla u všech chalkonů monohalogenovaných v poloze *para* kruhu B (**44**) vyšší než u mikonazolu. Vysokou účinnost měly tyto látky i proti *M. canis*, přičemž nejvyšší byla u fluorovaného derivátu.



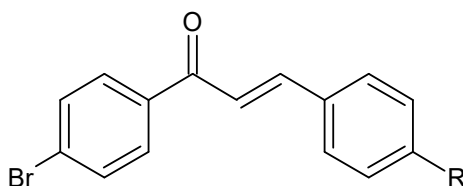
**45**  
R = F, Cl, Br

Také ve skupině dihalogenovaných chalkonů byl neúčinnější fluorovaný derivát **46**. Dichlorderivát **47** byl účinný také vůči *Aspergillus flavus*<sup>96</sup>.





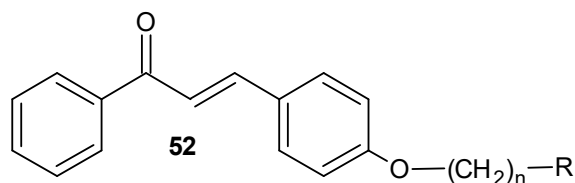
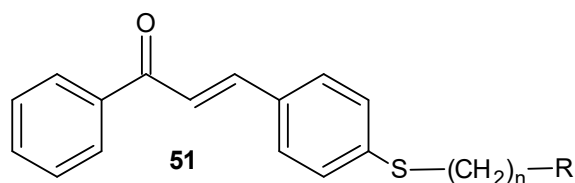
V další sérii chalkonů prokázal nejvyšší aktivitu proti *A. niger* 4'-brom-4-chlorchalkon (48). Odpovídající fluorovaný derivát (49) měl účinek slabší (srovnatelný s monobromderivátem (50)). V testu proti *A. flavus* byl chalkon 49 účinnější než chalkon 50<sup>98</sup>.



48: R = Cl; 49: R = F; 50: R = H

Důležitými EWG jsou také nitro- a kyanoskupina. Jejich elektron-odtahující vlastnosti jsou silnější než u halogenů a bylo by tedy možné očekávat výrazné zvýšení účinnosti sloučenin substituovaných těmito skupinami. V praxi tomu ale tak není. V sérii sloučenin připravených Lopézovou a kol.<sup>29</sup> měla nitroskupina pozitivní vliv na účinek, pokud byla v *para*-poloze kruhu B. V sérii xanthoxylinových derivátů<sup>30</sup> měl 4-nitrochalkon 44 účinek proti *T. rubrum* srovnatelný s odpovídajícím 4-chlorderivátem 42, ale slabší než odpovídající fluor- 41 a bromderivát 43. Ve studiích s kvasinkami<sup>31</sup> nebyl zaznamenán pozitivní vliv EWG (NO<sub>2</sub> a CN) na antifungální účinek. Výrazné ovlivnění aktivity nebylo pozorováno ani jinými autory<sup>36, 99</sup>. Nitroskupina v *meta*-poloze kruhu B vedla ke snížení aktivity<sup>100</sup>.

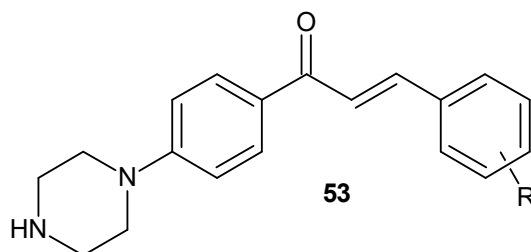
Z dalších chalkonů substituovaných na kruhu B je třeba zmínit bromované a bazicky substituované deriváty 4-sulfanylchalkonu 51 a 4-hydroxychalkonu 52. Většina těchto sloučenin byla mírně účinná proti *Microsporium gypseum* a některé též proti *C. albicans*<sup>101</sup>.



R = Br, morfolinyl, piperidinyl, 4-methylpiperidinyl, piperazinyl

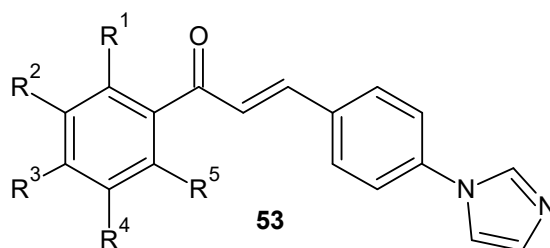
n = 4, 5, 6 nebo 10

Byly připraveny i chalkony substituované na kruzích heterocyklickým zbytkem vázaným přímo na benzenové jádro. Příkladem mohou být 3-fenyl-1-[4-(piperazin-1-yl)fenyl]prop-2-en-1-ony **53**, účinné proti *A. fumigatus*, *C. albicans*; *C. krusei* a *C. glabrata*. Nejvyšší účinnost proti všem kmenům měla sloučenina s nesubstituovaným kruhem B (R = H) <sup>100</sup>.



R = H, 3-CH<sub>3</sub>, 4-CH<sub>3</sub>, 4-OCH<sub>3</sub>, 3,4,5-trimethoxy, 4-Cl, 3-NO<sub>2</sub>

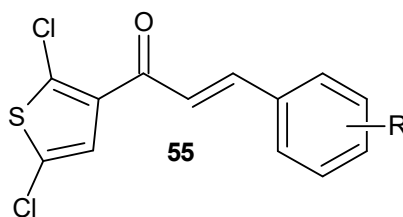
Hussain se spolupracovníky <sup>102</sup> zavedli do struktury chalkonu imidazol, který se již osvědčil při syntéze látek s antifungálním účinkem. Proti *A. fumigatus* byly neúčinnější látky substituované halogeny na kruhu A **54a–54h**, ale i chalkon bez substituce kruhu A **54i** prokázal silnou účinnost proti této houbě.



- a:  $R^1 = \text{Cl}$                       e:  $R^1 = R^2 = \text{F}$   
 b:  $R^3 = \text{Cl}$                       f:  $R^2 = R^3 = \text{F}$   
 c:  $R^1 = R^4 = \text{Cl}$                 g:  $R^1 = \text{Br}$   
 d:  $R^1 = R^5 = \text{Cl}$                 h:  $R^3 = \text{Br}$   
 i:  $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{H}$

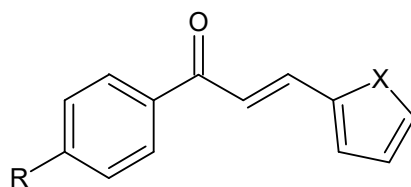
#### 4.3.2. Heterocyklické analogy chalkonů

Benzenu je svými vlastnostmi velmi blízký thiofen. Izosterní záměna těchto dvou kruhů byla aplikována i ve skupině chalkonů. Indičtí autoři<sup>100</sup> studovali sérii chalkonů obecného vzorce **55**. V testech proti *A. fumigatus*, *C. albicans*; *C. krusei* a *C. glabrata* byl neúčinnější chalkon bez substituce na kruhu B ( $R = \text{H}$ ).



$R = \text{H}, 3\text{-CH}_3, 4\text{-CH}_3, 4\text{-OCH}_3, 3,4,5\text{-trimethoxy}, 4\text{-Cl}, 3\text{-NO}_2$

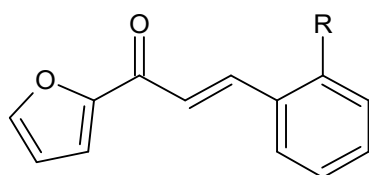
Chalkony, v nichž je thiofenem nahrazen kruh B **56**, studovali Karaman *et al.*<sup>103</sup> Připravili i jejich oxa-analogy s furanovým kruhem B **57**. Thiofenové deriváty **56** byly méně účinné než 1-fenyl-3-(furan-2-yl)chalkony **57**.



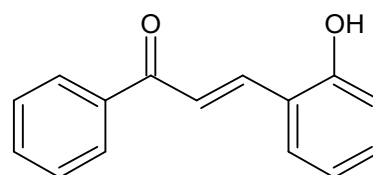
**56:** X = S; R = *p*-OCH<sub>3</sub>, *o*-OH, *p*-Cl, *m*-Br, *p*-Br

**57:** X = O; R = *o*-, *m*-, *p*-OCH<sub>3</sub>, *o*-, *m*-, *p*-Cl, *o*-, *m*-, *p*-Br, *o*-OH, *p*-OH  
*o*-, *m*-, *p*-NO<sub>2</sub>, *m*-NH<sub>2</sub>, *p*-NH<sub>2</sub>

Vysokou aktivitu proti *C. albicans* prokázal chalcon **57** (R = *p*-OH), dále derivát s obráceným uspořádáním kruhů substituovaný chlorem **58** nebo methylem **59** a také chalcon **60**. Nejvyšší aktivitu měl derivát **58**, což potvrzuje příznivý vliv halogenů na antifungální účinnost chalconů. Vysoká aktivita derivátu **59** je překvapivá, protože methyl patří mezi EDG.

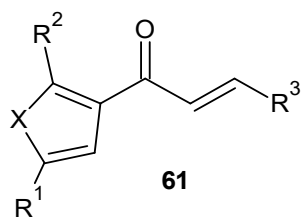


**58:** R = Cl  
**59:** R = CH<sub>3</sub>



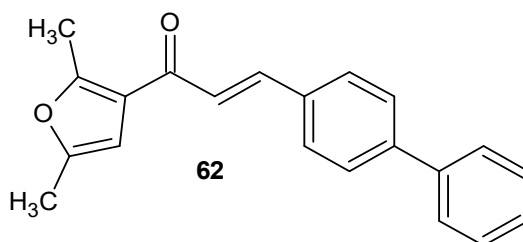
**60**

Zavedením furanu do molekuly chalconu se zabývala i další skupina vědců<sup>104</sup>. Jedno či obě benzenová jádra zaměnili za heterocykly s různým heteroatomem a získali sloučeniny obecného vzorce **61**. Všechny thiofenové deriváty byly účinné proti *A. niger* a *C. albicans*. S nimi srovnatelnou aktivitu měl také 3-([1,1'-bifeny]-4-yl)-1-(2,5-dimethylfuran-3-yl)prop-2-en-1-on (**62**). Ostatní furanové deriváty byly méně účinné.

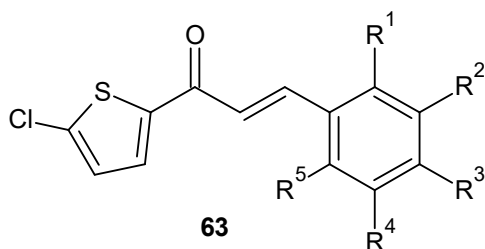


$R^1 = R^2 = \text{H, CH}_3$ ;  $X = \text{S, O}$ ;

$R^3 = p\text{-methoxyphenyl, [1,1'-biphenyl]-4-yl, indol-3-yl, 5-ethylfuran-2-yl, 1H-pyrrol-2-yl}$



5'-chlorthiofenové analogy chalkonů **63** byly účinné proti *Fusarium oxysporum*. Nejvyšší aktivitu měly fluorované deriváty **63a–63c** <sup>105</sup>.

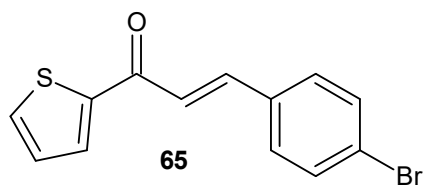
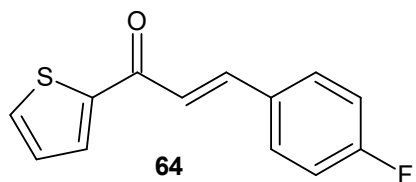


**a:**  $R^1 = \text{F, } R^2 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{H}$

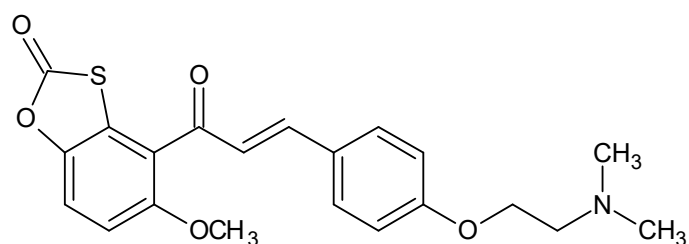
**b:**  $R^2 = \text{F, } R^1 = R^3 = R^4 = R^5 = \text{H}$

**c:**  $R^3 = \text{F, } R^1 = R^2 = R^4 = R^5 = \text{H}$

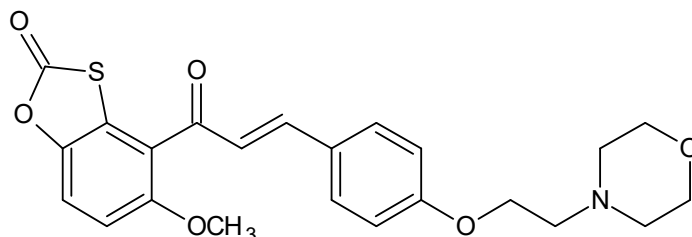
V sérii 3-fenyl-1-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-onů byly halogenované deriváty **64** a **65** účinné proti *C. albicans* ATCC 62342, ale neúčinné proti klinickým izolátům tohoto patogenu <sup>106</sup>.







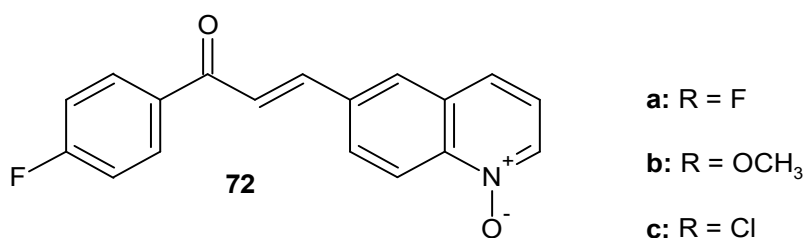
70



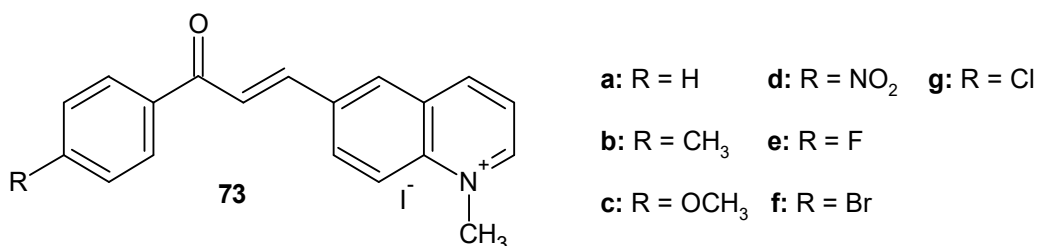
71

5-methoxy-4-(3-{4-[2-(dimethylamino)ethoxy]fenyl}prop-2-enoyl)-1,3-benzoxathiol-2-on (**70**) byl podroben řadě testů za účelem zjistit mechanismus antimykotického účinku. Tato sloučenina má fungistatické účinky, přičemž fungicidní účinek se dostavuje až při mnohonásobně větší koncentraci, než je MIC. Ovlivňuje syntézu  $\beta(1\rightarrow3)$ glukanu a chitinu. V případě kvasinek brání jejich přeměně na vláknitou formu. Je považován za slibný pro další vývoj antimykoticky účinných molekul <sup>3</sup>.

Dusíkaté analogy chalkonů často obsahují v molekule chinolin. De Carvahlo Tavares se spolupracovníky <sup>109</sup> studovali 1-fenyl-3-chinolin-6-ylprop-2-en-1-ony, jejich *N*-oxidy a kvartérní *N*-methylderiváty. Téměř všechny látky inhibovaly růst *Paracoccidioides brasiliensis* – dimorfní houby, jejíž nákazou trpí miliony lidí v latinské Americe. Nejúčinnější byl fluorovaný *N*-oxid **72a**. Dobrá účinnost byla zaznamenána také u sloučenin **72b** a **72c**. Sloučeniny **72a** a **72b** byly vybrány pro podrobnější studii za použití 14 klinických izolátů *P. brasiliensis* a 3 izolátů *P. lutzii*. Bylo provedeno i testování na myších a bylo zjištěno, že aktivita testovaných sloučenin je srovnatelná s itraconazolem <sup>110</sup>.

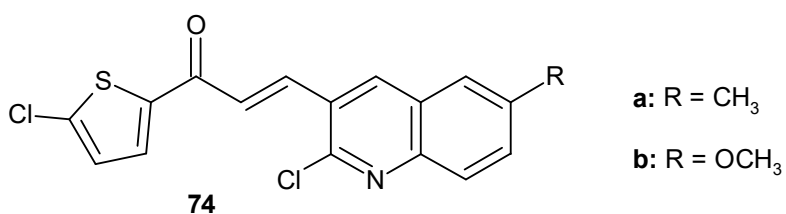


Citlivá byla i houba *Cryptococcus gattii*, nejvíce na soli *N*-methylderivátů **73a–73g** <sup>109</sup>.

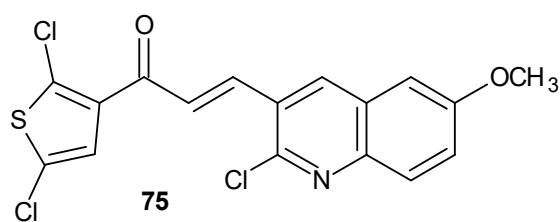


Vůči kandidám (*C.albicans*, *C.parapsilosis*) byly studované sloučeniny neúčinné. Sloučeniny **73e**, **73f** a **73g** inhibovaly *C. tropicalis*. Bylo také zjištěno, že účinné sloučeniny patrně zasahují do syntézy buněčné stěny <sup>109</sup>.

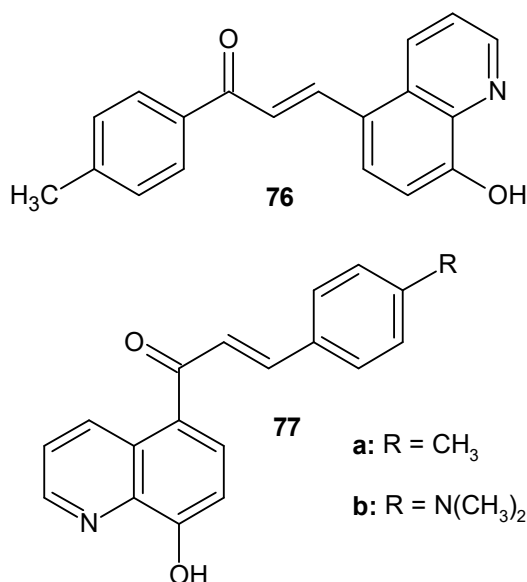
Další studie byla věnována prop-2-en-1-onům, v nichž kruh B je 2-chlorchinolin-3-yl a kruh A byl nahrazen různě substituovaným thiofenem, furanem, pyrrolem nebo kondenzovanými heterocykly. Sloučeniny byly testovány proti *A.flavus*, *A.niger* a *Curvularia lunata*. Antifungální účinnost měly pouze sloučeniny **74a**, **74b** a **75**, v nichž kruh A byl chlorovaný thiofen. Prokázaly větší antifungální aktivitu proti všem testovaným druhům než flukonazol <sup>111</sup>.



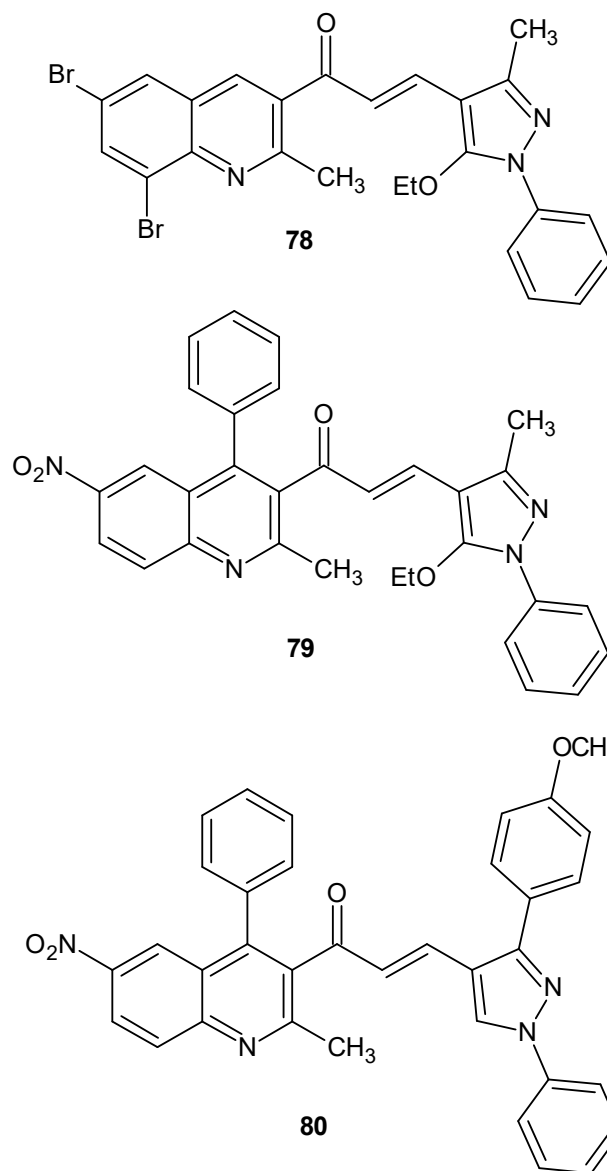




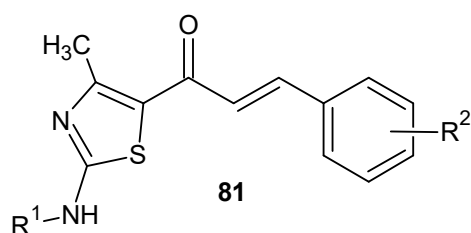
Marrugo-González *et al.*<sup>112</sup> připravili chinolinové analogy chalconů dvojího typu. 3-(8-hydroxychinolin-5-yl)-1-(4-methylfenyl)prop-2-en-1-on (**76**), 1-(8-hydroxychinolin-5-yl)-3-(4-methylfenyl)prop-2-en-1-on (**77a**) a 3-[4-(dimethylamino)fenyl]-1-(8-hydroxychinolin-5-yl)prop-2-en-1-on (**77b**) byly testovány na panelu kvasinek a plísní a byla u nich zjištěna slabá až střední antifungální aktivita vůči všem kmenům.



Další sérií analogů jsou chinolinyl-pyrazolylové analogy chalconů testované proti *C. albicans* a *A. niger*. Nejvyšší aktivitu proti *C. albicans* měly sloučeniny **78**, **79** a **80**. Růst *A. niger* nejvíce inhiboval derivát **80**<sup>113</sup>.



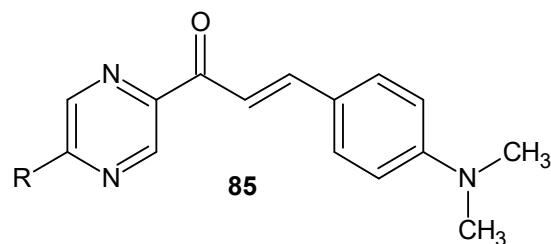
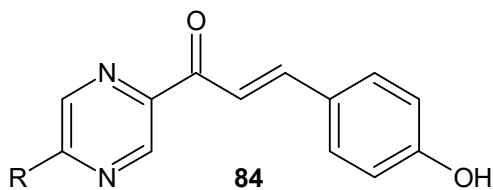
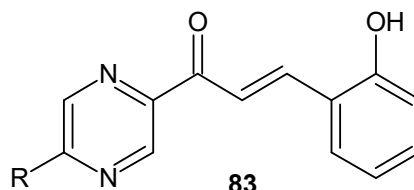
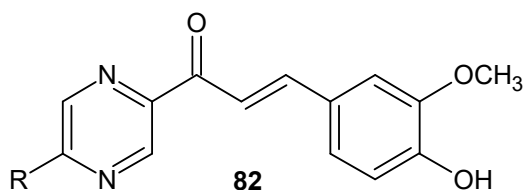
Liaras se spolupracovníky <sup>114, 115</sup> studovali 1-(4-methyl-2-(alkylamino)thiazol-5-yl)-3-arylprop-2-en-1-ones obecného vzorce **81**. Všechny sloučeniny byly aktivní proti *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron*, *Trichoderma viride* a *C. albicans*. Nejlepší aktivity měly deriváty substituované na kruhu B halogeny,



$R^1 = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, \text{C}_3\text{H}_7$

$R^2 = \text{H}, 4\text{-NO}_2, 3\text{-NO}_2, 4\text{-F}, 3\text{-F}, 4\text{-Cl}, 3\text{-Cl}, 2\text{-Cl}, 3\text{-Br}, 4\text{-OCH}_3, 2\text{-OCH}_3, 2,6\text{-diCl}, 2,4\text{-diCl}, 2,3\text{-diCl}, 3\text{-CH}_3$

Mezi heterocyklické analogy chalkonů patří také 3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ony, kterými se dlouhodobě zabývá Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Do první publikované studie<sup>116</sup> byly zařazeny různě substituované 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylpropen-2-en-1-ony **82–84**.



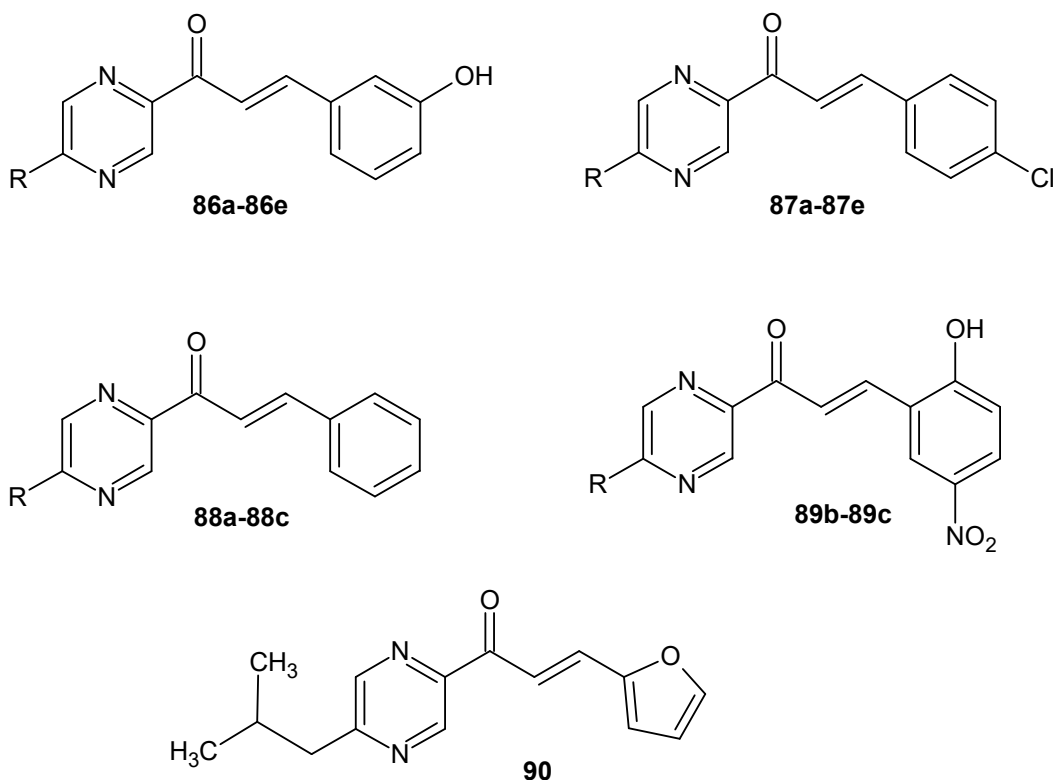
**a:**  $R = \text{H}$ ; **b:**  $R = (\text{CH}_3)_3\text{C}$ ; **c:**  $R = (\text{CH}_3)\text{CHCH}_2$ ; **d:**  $R = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$ ; **e:**  $R = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2$

U zmíněných látek byla testována účinnost proti kmenům *Candida albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.glabrata*, *Trichosporon asahii*(dříve *T. beigelli*), *Aspergillus fumigatus*, *Lichtheimia corymbifera* (dříve *Absidia corymbifera*) a *Trichophyton*

*mentagrophytes*. Růst *T. mentagrophytes* inhibovaly sloučeniny **83a** a **83c–83e** a **84a**, **84d** a **84e**, přičemž látky s hydroxylem v poloze *ortho* měly silnější účinek než *para*-substituované deriváty. V těchto dvou sériích byly nejúčinnější deriváty s nerozvětveným alkylem na pyrazinovém jádře. Účinné byly také sloučeniny s nesubstituovaným pyrazinem (**83a** a **84a**). Rozvětvené alkyly byly pro antifungální účinek nevhodné. Látka **83a** byla mírně účinná i proti *C. albicans*.

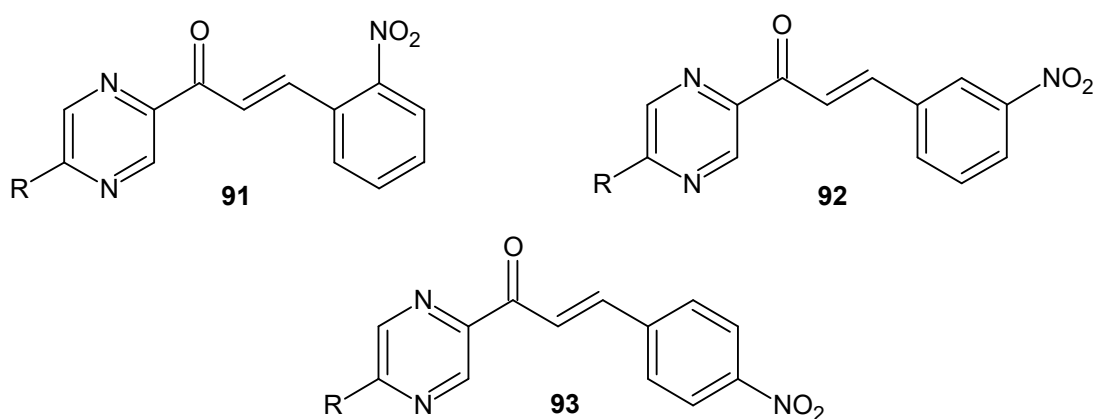
Později byly studovány analogické sloučeniny jinými substituenty na kruhu B **86–89** a jeden derivát, v němž je kruh B tvořen furanem **90**. Nejcitlivějším kmenem byl i v tomto případě *T. mentagrophytes*, některé sloučeniny inhibovaly i růst *A. fumigatus* a *Candida* spp.

Na rozdíl od předchozí studie byly účinné i některé deriváty substituované na pyrazinovém kruhu objemným *tert*-butylem. Vzhledem k neúplnosti sérií a špatné rozpustnosti některých sloučenin nebylo možné odvodit přesnější SAR<sup>117</sup>.



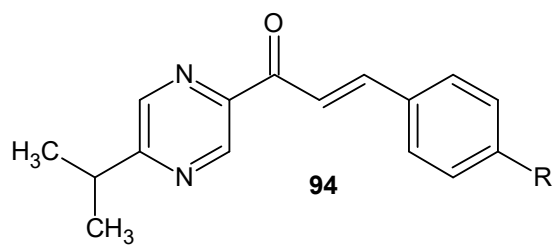
**a:** R = H; **b:** R = (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C; **c:** R = (CH<sub>3</sub>)CHCH<sub>2</sub>; **d:** R = CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, **e:** R = CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>

Třetí studie byla věnována (*E*)-3-(nitrofenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onům **91**, **92** a **93**<sup>28</sup>. Substituce v poloze 5 pyrazinu různými alkyly odpovídala předcházejícím pracím. Ačkoli látky nemají v molekule fenolickou skupinu, vykazovaly antifungální účinky (v mnoha případech dokonce vyšší než odpovídající hydroxylované analogy). Nejvyšší účinnost byla zaznamenána proti *T. mentagrophytes*. Nejnižší MIC měly 3-nitrofenylderiváty **92**, kde R = H, propyl nebo butyl, ale i některé 2-nitro- a 4-nitrofenylderiváty s nerozvětveným alkylem na pyrazinovém jádře. Přítomnost terciárního butylu byla pro antifungální účinek nevhodná.



a: R = H; b: R = (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C; c: R = (CH<sub>3</sub>)CHCH<sub>2</sub>; d: R = CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, e: R = CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>

Pro ověření vlivu rozvětveného alkyly na pyrazinovém jádře na antifungální účinek byla připravena série sloučenin substituovaných isopropylem **94** a jejich inhibiční účinek vůči *T. mentagrophytes* byl porovnán s dříve publikovanými 3-(subst. fenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ony. V 5 případech byl propylderivát účinnější než odpovídající isopropylderivát, ve 4 případech tomu bylo obráceně a u jedné sloučeniny nebylo srovnání možné kvůli špatné rozpustnosti isopropylderivátu. Jednoznačný závěr tedy nemohl být učiněn. Účinnost 1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-3-(2-nitrofenyl)-prop-2-en-1-onu **94g** a 1-(5-isopropylpyrazin-2-yl)-3-(4-nitrofenyl)prop-2-en-1-onu **94i** byla srovnatelná s flukonazolem. To svědčí pro pozitivní vliv nitroskupiny na kruhu B pro antifungální účinnost. V případě 3-nitroderivátu **94h** bohužel nemohla být určena MIC, protože byl nedostatečně rozpustný ve vodě<sup>8</sup>.



**a:** R = 2-OH; **b:** R = 3-OH; **c:** R = 4-OH; **d:** R = 3-OCH<sub>3</sub>, 4-OH; **e:** R = 2-OCH<sub>3</sub>;

**f:** R = 4-OCH<sub>3</sub>; **g:** R = 2-NO<sub>2</sub>; **h:** R = 3-NO<sub>2</sub>; **i:** R = 4-NO<sub>2</sub>; **j:** R = 4-Cl

## 5. Experimentální část

Výchozí 5-alkylpyrazin-2-karbonitrily a odpovídající 5-alkyl-1-pyrazin-2-yl-ethanony byly připraveny dříve publikovanými postupy<sup>118, 119</sup>. Při přípravě byly použity komerčně dostupné výchozí sloučeniny a totožnost a čistota připravených meziproductů byly ověřeny pomocí TLC srovnáním se standardem a v případě 5-alkyl-1-pyrazin-2-yl-ethanonů také porovnáním teploty varu s publikovanými hodnotami. Reakcí výše uvedených meziproductů s komerčně dostupnými fluorovanými aldehydy byly získány požadované (2*E*)-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(2-fluorfenyl)prop-2-en-1-ony a (2*E*)-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(4-fluorfenyl)prop-2-en-1-ony.

TLC chromatografie byla prováděna na deskách s vrstvou silikagelu (Aluminium Sheets, Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck, Darmstadt, Germany). Jako mobilní fáze byla používána směs benzín + ethyl-acetát 80:20 (v/v).

Vzorky látek pro analýzu byly sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným při tlaku 1.33 kPa.

Teploty tání byly stanoveny na mikrovýhřevném bloku podle Böetia HMK 73/4615 (VEB Analytik, Dresden, Germany) a nebyly korigovány.

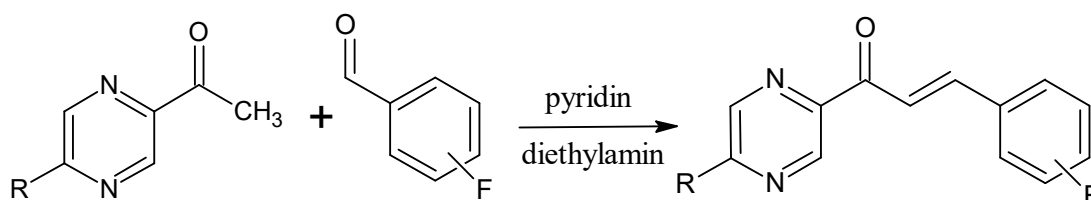
Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru EA 1110 CHNS firmy Carlo Erba.

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET 6700 metodou ATR-Ge. Vlnočty jsou uváděny v cm<sup>-1</sup>.

NMR spektra byla měřena v chloroformu na přístroji VARIAN Mercury-VxBB 300 (300 MHz pro <sup>1</sup>H-NMR a 75 MHz pro <sup>13</sup>C-NMR), případně na přístroji VNMR S500 (500 MHz pro <sup>1</sup>H-NMR a 125 MHz pro <sup>13</sup>C-NMR). Chemické posuny jsou uvedeny v δ, ppm a nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) prostřednictvím signálu rozpouštědla (7.26 <sup>1</sup>H a 77.0 pro <sup>13</sup>C).

### 5.1. Obecný postup přípravy (2E)-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-(fluorfenyl)prop-2-en-1-onů

1-pyrazin-2-yl-ethanon (0.015 mol) a aldehyd (0.015 mol) byly rozpuštěny v 6.6 ml pyridinu. Po přidání diethylaminu 1.1 g (0.015 mol) byla směs zahřívána 1 hodinu na glycerinové lázni při teplotě 80–120 °C. Po zchladnutí byla směs nalita do 300 ml ledové vody okyselené kyselinou octovou na pH 3 a uložena na 24 hodin do lednice. Vyloučená směs pevné a olejovité látky byla vytřepána do etheru a po přidání malého množství silikagelu (Silikagel 60 Fluka, 0.063–0.2 mm; 30–50 g) byla směs odpařena do sucha.

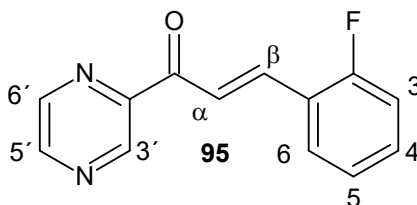


Opakovanou sloupcovou chromatografií na silikagelu (Silikagel 60 Merck, 0.040–0.063 mm) byl požadovaný produkt oddělen od nezreagovaných výchozích složek a vedlejších červeně zbarvených produktů. Pro analýzu a biologické hodnocení byl produkt krystalizován z bezvodého ethanolu.

Tímto postupem byly získány následující produkty.



## 5.2. (2E)-3-(2-fluorfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (95)



Molekulová hmotnost: 228.22 (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O)

Výtěžek: 18 %

Vzhled: světle žlutá práškovitá látka

Teplota tání: 110–111 °C (114–115 °C) <sup>120</sup>

Elementární analýza:

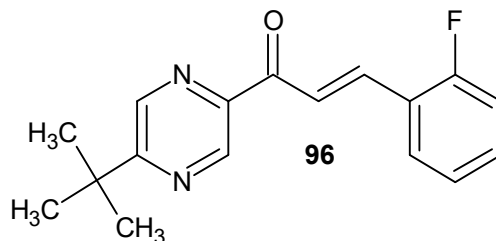
	% C	% H	% N
<b>Vypočteno:</b>	68.42	3.97	12.27
<b>Nalezeno:</b>	68.20	4.09	12.55

IČ spektrum: 1670 (C=O), 1597 (C=C)

<sup>1</sup>H NMR spektrum (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.36 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, H3'), 8.37 (d, 1H, *J* = 2.5 Hz, H6'), 8.70–8.68 (m, 1H, H5'), 8.23 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, β-CH), 8.10 (d, 1H, *J* = 16.2 Hz, α-CH), 7.80–7.70 (m, 1H, H6), 7.45–7.35 (m, 1H, H4), 7.24–7.08 (2H, H3, H5)

<sup>13</sup>C NMR spektrum (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188.6, 161.9 (d, *J*=255.1 Hz), 148.3, 147.5, 144.9, 143.4, 138.0 (d, *J*=3.2 Hz), 132.4 (d, *J*=8.6 Hz), 129.5 (d, *J*=2.6 Hz), 124.5 (d, *J*=3.7 Hz), 122.9 (d, *J*=11.4 Hz), 123.3 (d, *J*=6.3 Hz), 116.3 (d, *J*=22.1 Hz)

### 5.3. (2E)-1-(5-*tert*-butylpyrazin-2-yl)-3-(2-fluorfenyl)prop-2-en-1-on (96)



Molekulová hmotnost: 284.33 (C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O)

Výtěžek: 13 %

Vzhled: žluté krystaly

Teplota tání: 97–99 °C

Elementární analýza:

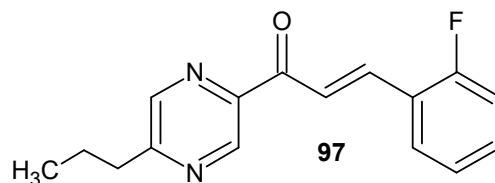
	% C	% H	% N
<b>Vypočteno:</b>	71.81	6.03	9.85
<b>Nalezeno:</b>	71.72	6.36	10.28

IČ spektrum: 1671 (C=O), 1604 (C=C)

<sup>1</sup>H NMR spektrum (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.27 (s, 1H, H3'), 8.73 (s, 1H, H6'), 8.23 (d, 1H, *J*=16.1 Hz, β-CH), 8.08 (d, 1H, *J*=16.1 Hz, α-CH), 7.74 (d, 1H, *J*=7.6 Hz, H6), 7.42–7.35 (m, 1H, H4), 7.19 (t, 1H, *J*=7.6 Hz, H5), 7.015–7.09 (m, 1H, H3), 1.44 (s, 9H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR spektrum (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188.6, 167.7, 161.9 (d, *J*=255.3 Hz), 145.6, 143.3, 139.9, 137.4 (d, *J*=2.9 Hz), 132.1 (d, *J*=8.9 Hz), 129.4 (d, *J*=3.0 Hz), 124.4 (d, *J*=3.9 Hz), 123.0 (d, *J*=11.8 Hz), 122.7 (d, *J*=5.8 Hz), 116.2 (d, *J*=21.6 Hz), 37.1, 30.9

#### 5.4. (2E)-3-(2-fluorfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (97)



Molekulová hmotnost: 270.30 (C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>O)

Výtěžek: 20 %

Vzhled: žlutá krystalická látka

Teplota tání: 66–67 °C

Elementární analýza:

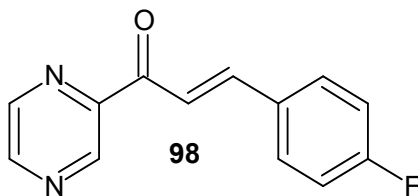
	% C	% H	% N
<b>Vypočteno:</b>	71.10	5.59	10.36
<b>Nalezeno:</b>	71.15	5.88	10.89

IČ spektrum: 1672 (C=O), 1603 (C=C)

<sup>1</sup>H NMR spektrum (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.26 (s, 1H, H3'), 8.52 (s, 1H, H6'), 8.22 (d, 1H, J=16.1 Hz, β-CH), 8.08 (d, 1H, J=16.1 Hz, α-CH), 7.77–7.72 (m, 1H, H6), 7.41–7.35 (m, 1H, H4), 7.18 (t, 1H, J=7.3 Hz, H5), 7.14–7.09 (m, 1H, H3), 2.88 (t, 2H, J=7.5 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.87–1.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.99 (t, 3H, J=7.5 Hz, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR spektrum (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188.6, 161.9 (d, J=255.1 Hz), 161.1, 146.0, 144.1, 142.8, 137.5 (d, J=3.0 Hz), 132.2 (d, J=8.8 Hz), 129.4 (d, J=2.9 Hz), 124.4 (d, J=3.9 Hz), 123.0 (d, J=10.8 Hz), 122.6 (d, J=5.9 Hz), 116.2 (d, J=21.5 Hz), 37.7, 22.5, 13.7

### 5.5. (2*E*)-3-(4-fluorfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (98)



Molekulová hmotnost: 228.22 (C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O)

Výtěžek: 6 %

Vzhled: světle žlutá práškovitá látka

Teplota tání: 120–124°C

Elementární analýza:

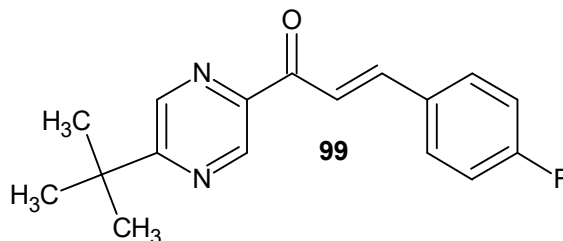
	% C	% H	% N
<b>Vypočteno:</b>	68.42	3.97	12.27
<b>Nalezeno:</b>	67.98	4.12	12.17

IČ spektrum: 1671 (C=O), 1601 (C=C)

<sup>1</sup>H NMR spektrum (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.37 (s, 1H, H3'), 8.77 (s, 1H, H5'), 8.68 (s, 1H, H6'), 8.11 (d, 1H, *J*=15.9 Hz, β-CH), 7.93 (d, 1H, *J*=15.9 Hz, α-CH), 7.78–7.65 (m, 2H, H2, H6), 7.11 (t, 2H, *J*=8.2 Hz, H3, H5)

<sup>13</sup>C NMR spektrum (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188.4, 166.0, 162.6, 148.3, 147.5, 144.8, 144.3, 143.3, 131.0 (d, *J*=3.4 Hz), 130.9 (d, *J*=8.6 Hz), 119.7 (d, *J*=2.3 Hz), 116.2 (d, *J*=22.0 Hz)

## 5.6. (2*E*)-1-(5-*tert*-butylpyrazin-2-yl)-3-(4-fluorfenyl)prop-2-en-1-on (99)



Molekulová hmotnost: 284.33 (C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>FN<sub>2</sub>O)

Výtěžek: 15 %

Vzhled: světle žluté jemné krystaly

Teplota tání: 136–138 °C

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
<b>Vypočteno:</b>	71.81	6.03	9.85
<b>Nalezeno:</b>	71.54	6.22	10.16

IČ spektrum: 1669 (C=O), 1608 (C=C)

<sup>1</sup>H NMR spektrum(300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.28 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, H3'), 8.73 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz, H6'), 8.10 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, β-CH), 7.90 (d, 1H, *J* = 16.0 Hz, α-CH), 7.75–7.66 (m, 2H, H2, H6), 7.11 (t, 2H, *J* = 8.7 Hz, H3, H5), 1.45 (s, 9H, CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C NMR spektrum(75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 188.5, 167.7, 165.9, 162.5, 145.6, 143.8, 143.3, 139.8, 131.2 (d, *J*=3.5 Hz), 130.8 (d, *J*=8.6 Hz), 120.1 (d, *J*=2.3 Hz), 116.1 (d, *J*=21.7 Hz), 37.1, 29.7

## 5.7. Hodnocení antifungální aktivity

Pomocí modifikované mikrodiluční bujónové metody (CSLI standardy<sup>121, 122</sup>) byla otestována citlivost vůči *Candida albicans* (ATCC 44859 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, CA) a klinickým izolátům kmenů *C.tropicalis* 156 (CT), *C.krusei* E28 (CK), *C.glabrata* 20/I (CG), *Trichosporon asahii* 1188 (TA), *Aspergillus fumigatus* 231 (AF), *Lichheimia corymbifera* 272 (LC), *Trichophyton mentagrophytes* 445 (TM).

Všechny kmeny byly pěstovány na Sabouraudově dextrosovém agaru (SDA, Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI, USA) a uchovány při teplotě 4 °C. Před samotným testováním byly kmeny naočkovány na SDA a houbová inokula byla připravena suspendováním kvasinek, konidií či sporangiospor ve sterilním 0.85% roztoku chloridu sodného. Pomocí Bürkerovy komůrky byla hustota buněk v zásobní suspenzi upravena na hodnotu  $1.0 \pm 0.2 \times 10^5$  CFU/ml pro kvasinky a  $1.0 \pm 0.2 \times 10^6$  CFU/ml pro plísně. Ředěním zásobní suspenze 1:20 testovacím médiem byly připraveny konečná inokula použitá pro testování antimykotické aktivity.

Testované látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO). Jako medium pro testování antimykotické aktivity bylo použito tkáňové kultivační medium RPMI 1640 (KlinLab, Prague, Česká Republika) pufované na pH 7.0 pomocí 0.165M 3-morfolinopropansulfonové kyseliny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Připraven byl také kontrolní vzorek bez obsahu aktivních látek. Konečná koncentrace DMSO nepřesahuje 1 %. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro kvasinky a kvasinkám blízké mikroorganismy byla stanovena jako 80% nebo vyšší inhibice růstu a pro vláknité houby jako 50% nebo vyšší inhibice růstu oproti kontrolnímu vzorku vždy po 24 a 48 hodinách inkubace při teplotě 35 °C bez přístupu světla, jedinou výjimkou byla kultivace *T. mentagrophytes*, kdy inkubace trvala 72 a 120 hodin.

Jako pozitivní kontroly byla použity flukonazol a vorikonazol. Hodnoty pro terbinafin byly převzaty z literatury<sup>123</sup>.

Výsledky testů jsou uvedeny v tabulce 1.

## 6. Diskuse

Úkolem mé práce byla syntéza fluorovaných (2*E*)-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-fenylprop-2-en-1-onů. Připravila jsem dva typy chalkonů, jednak látky s fluorem v poloze *ortho* benzenového jádra a taktéž látky s fluorem v poloze *para*. Nejprve byly připraveny nealkylované sloučeniny a poté jsem přistoupila k látkám substituovaných *terc*-butylem nebo propylem v poloze 5 pyrazinu.

V teoretické části své práce jsem se věnovala aktuální problematice mykóz. S ohledem na narůstající problém systémových a nosokomiálních mykóz jsem uvedla přehled jejich původců. Nevyhnula jsem se však ani původcům kožních a slizničních mykóz, protože jsou v populaci velmi běžné a jejich léčba je též obtížná. Navázala jsem přehledem antimykotik používaných v léčbě mykóz. Poslední úsek je přehledem přírodních chalkonů s antifungálním účinkem. Zaměřila jsem se také na možnosti zvýšení účinnosti chalkonů obměnami jejich struktury.

V experimentální části jsem navázala na dlouholetý výzkum 3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onů alkylovaných na pyrazinovém jádře, který probíhá na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Syntéza probíhala dle již dříve používaných postupů Claisen-Schmidtovou kondenzací acetylpyrazinů s aromatickými aldehydy<sup>8, 116, 117, 119</sup>.

Pro oddělení požadovaných produktů od nezreagovaných výchozích látek bylo nutné opakované dělení sloupcovou chromatografií. Dělení probíhalo obtížně a výtěžky (po první krystalizaci odparků odpovídajících frakcí) se pohybovaly mezi 6 a 20%, přičemž nejmenší byl u (2*E*)-3-(4-fluorfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu (**98**) a nejvyšší u (2*E*)-3-(2-fluorfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)-prop-2-en-1-onu (**97**). Všechny látky se vyznačovaly žlutou barvou a krystalickou strukturou, jen látka **98** byla práškovitá.

Pro ověření čistoty byly změřeny teploty tání. Teplota tání (2*E*)-3-(2-fluorfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-onu (**95**) odpovídala hodnotám popsáným v literatuře<sup>120</sup>. Další ověření čistoty produktů bylo provedeno elementární analýzou a jejich struktura byla potvrzena IČ a NMR spektry.

Při testování antifungální účinnosti byl potvrzen antimykotický potenciál fluorovaných (2*E*)-1-(5-alkylpyrazin-2-yl)-3-fluorfenylprop-2-en-1-onů. Nejširší spektrum účinku i nejvyšší účinnost vykazovaly nealkylované látky **95** a **98**. Jejich MIC byly nízké vůči všem testovaným kmenům kromě *A. fumigatus* a *L. corymbifera* a srovnatelné s látkami

z předešlých prací. Překvapivá je neúčinnost derivátu **95** na *T. mentagrophytes*, protože tento dermatofyt bývá vůči působení chalkonů a jejich analogů nejcitlivější. Rovněž v případě (2*E*)-3-(2-fluorfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on (**97**) byla na základě dříve publikovaných údajů očekávána vyšší účinnost. Sloučeniny **96** a **99** byly neúčinné, což je v souladu s dřívějšími údaji o nepříznivém vlivu *terc*-butylu na antifungální aktivitu pyrazinových analogů chalkonů<sup>8, 116, 117, 118</sup>. Aktivita 4-fluorderivátu byla srovnatelná s flukonazolem.

**Tabulka 1.** Antifungální aktivita sloučenin **95–99** ve srovnání se standardy

KMEN		MIC (μmol/l)							TER
		IC <sub>80</sub> nebo vyšší pro kvasinky a kvasinkovité mikroorganismy					IC <sub>50</sub> nebo vyšší pro vláknité houby		
		95	96	97	98	99	FLU <sup>a</sup>	VOR <sup>a</sup>	
CA	24h	<b>15.63</b>	>250	<b>125</b>	<b>31.25</b>	>125	0.24	0.005	>6.86 <sup>b</sup>
	48h	<b>62.5</b>	>250	500	<b>62.5</b>	>125	0.24	0.007	
CT	24h	250	>250	>500	<b>62.5</b>	>125	>500	125	>6.86 <sup>b</sup>
	48h	>500	>250	>500	<b>125</b>	>125	>500	250	
CK	24h	<b>15.63</b>	>250	>500	<b>31.25</b>	>125	125	0.65	>6.86 <sup>b</sup>
	48h	<b>125</b>	>250	>500	<b>62.5</b>	>125	250	1.95	
CG	24h	<b>62.5</b>	>250	250	<b>62.5</b>	>125	41.64	83.58	>6.86 <sup>b</sup>
	48h	<b>125</b>	>250	>500	<b>125</b>	>125	250	250	
TA	24h	<b>125</b>	>250	500	<b>62.5</b>	>125	250	3.26	N <sup>b</sup>
	48h	<b>125</b>	>250	>500	<b>250</b>	>125	500	14.32	
AF	24h	250	>250	>500	<b>250</b>	>125	>500	0.49	N <sup>b</sup>
	48h	>500	>250	>500	>500	>125	>500	1.3	
LC	24h	>500	>250	>500	>500	>125	>500	208	N <sup>b</sup>
	48h	>500	>250	>500	>500	>125	>500	250	
TM	72h	250	>250	>500	<b>7.81</b>	>125	<b>6.51</b>	0.08	0.01– 1.72 <sup>b</sup>
	120h	250	>250	>500	<b>15.63</b>	>125	<b>104</b>	0.12	

FLU = flukonazol, VOR = vorikonazol; TER = terbinafin

<sup>a</sup>Kučerová-Chlupáčová a kol.<sup>8</sup>; <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> po sedmidenní inkubaci, N = údaj neuveden<sup>123</sup>

V následujících tabulkách jsou MIC mnou připravených sloučenin **95** a **98** srovnány s účinky sloučenin nesoucích na kruhu B jiné substituenty.

**Tabulka 2:** Srovnání antifungální účinnosti chalkonu **95** s jeho analogy



KMEN		Substituent na kruhu B / MIC(μmol/l)						
		2-H <sup>a</sup>	2-F <sup>b</sup>	2-Cl <sup>c</sup>	2-Br <sup>c</sup>	2-NO <sub>2</sub>	2-OH	2-OCH <sub>3</sub> <sup>g</sup>
CA	24h	15.63	15.63	N	N	31.25 <sup>d</sup>	62.5 <sup>f</sup>	31.25
	48h	31.25	62.5	N	N	62.5 <sup>d</sup>	125 <sup>f</sup>	125
CT	24h	31.25	250	N	N	250 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	31.25
	48h	62.5	>500	N	N	500 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	62.5
CK	24h	31.25	15.63	N	N	62.5 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	>125
	48h	62.5	125	N	N	62.5 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	>125
CG	24h	31.25	62.5	N	N	31.25 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	31.25
	48h	62.5	125	N	N	31.25 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	125
TA	24h	250	125	N	N	500 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	>125
	48h	250	125	N	N	1000 <sup>d</sup>	>500 <sup>d</sup>	>125
AF	24h	125	250	N	N	125 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	>125
	48h	125	>500	N	N	1000 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	>125
LC	24h	250	>500	N	N	500 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	>125
	48h	500	>500	N	N	1000 <sup>d</sup>	250 <sup>d</sup>	>125
TM	72h	7.81	250	N	N	31.25 <sup>e</sup>	15.63 <sup>f</sup>	31.25
	120h	15.63	250	N	N	31.25 <sup>e</sup>	31.25 <sup>f</sup>	125

<sup>a</sup>Chlupáčová <sup>117</sup>; <sup>b</sup>sloučenina 95, tato práce; <sup>c</sup>dosud nepublikováno; <sup>d</sup>Opletalová <sup>124</sup> **Chyba! Záložka není definována.**; <sup>e</sup>Opletalová <sup>28</sup>; <sup>f</sup>Opletalová <sup>116</sup>; <sup>g</sup>Chlupáčová <sup>125</sup>

**Tabulka 3:** Srovnání antifungální účinnosti chalkonu 98s jeho analogy

KMEN		Substituent na kruhu B / MIC (μmol/l)						
		4-H <sup>a</sup>	4-F <sup>b</sup>	4-Cl <sup>a</sup>	4-Br <sup>d</sup>	4-NO <sub>2</sub>	4-OH	4-OCH <sub>3</sub> <sup>i</sup>
CA	24h	15.63	31.25	125 <sup>c</sup>	15.63	31.25 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	62.5
	48h	31.25	62.5	125 <sup>c</sup>	31.25	62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	125
CT	24h	31.25	62.5	125 <sup>c</sup>	31.25	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	125
	48h	62.5	125	>250 <sup>c</sup>	125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	250
CK	24h	31.25	31.25	125 <sup>c</sup>	32.6	31.25 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	125
	48h	62.5	62.5	125 <sup>c</sup>	>125	31.25 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	250
CG	24h	31.25	62.5	125 <sup>c</sup>	>125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	125
	48h	62.5	125	250 <sup>c</sup>	>125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	125
TA	24h	250	62.5	>250 <sup>c</sup>	>125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	500
	48h	250	250	>250 <sup>c</sup>	>125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	>500
AF	24h	125	250	125 <sup>c</sup>	>125	62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	62.5
	48h	125	>500	125 <sup>c</sup>	>125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	125
LC	24h	250	>500	>250 <sup>c</sup>	>125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	500
	48h	500	>500	>250 <sup>c</sup>	>125	>62.5 <sup>e</sup>	>250 <sup>g</sup>	>500
TM	72h	7.81	7.81	≤125 <sup>c</sup>	3.9	15.63 <sup>f</sup>	62.5 <sup>h</sup>	31.25
	120h	15.63	15.63	≤125 <sup>c</sup>	7.81	15.63 <sup>f</sup>	125 <sup>h</sup>	62.5

<sup>a</sup>Chlupáčová <sup>117</sup>; <sup>b</sup>sloučenina 98, tato práce; <sup>c</sup>sloučenina byla špatně rozpustná ve vodě a byly testovány pouze dvě koncentrace; <sup>d</sup>Tyllová <sup>126</sup>; <sup>e</sup>Peterka <sup>127</sup>; <sup>f</sup>Opletalová <sup>28</sup>; <sup>g</sup>Opletalová <sup>124</sup>; <sup>h</sup>Opletalová <sup>116</sup>; <sup>i</sup>Chlupáčová <sup>125</sup>

Tabulka 2 a Tabulka 3 ukazují, že (2*E*)-3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ony jsou účinné proti *Candida* spp. a *T. mentagrophytes*. Některé sloučeniny inhibovaly slabě až velmi slabě (MIC = 62.5–125 μmol/l) i růst ostatních kmenů.

Substituenty na kruhu B modulují účinnost jen mírně. Na základě dosud získaných výsledků lze říci, že aktivita fluorovaných derivátů je přibližně stejná jako aktivita nesubstituovaného (2*E*)-3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-onu. Pro srovnání s ostatními halogeny bohužel není k dispozici dostatek údajů.

O něco méně účinné jsou nitro- a methoxyderiváty. Je zajímavé, že 2-methoxyderivát a 2-nitroderivát mají téměř stejnou aktivitu, přestože methoxy skupina je EDG a nitroskupina je EWG. Relativně nejslabší antifungální účinky mají hydroxylované sloučeniny.

## 7. Závěr

V rámci své rigorózní práce jsem připravila jednu již dříve popsanou sloučeninu:

- (2E)-3-(2-fluorfenyl)-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-on

Dále jsem získala čtyři nové látky, které nebyly dosud v literatuře popsány:

- (2E)-1-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-3-(2-fluorfenyl)prop-2-en-1-on
- (2E)-3-(2-fluorfenyl)-1-(5-propylpyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- (2E)-3-(4-fluorfenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-on
- (2E)-1-(5-*terc*-butylpyrazin-2-yl)-3-(4-fluorfenyl)prop-2-en-1-on

Sloučeniny byly podrobeny testování antifungálních účinků a jejich MIC srovnány s analogy substituovanými na kruhu B jinými substituenty. Z tohoto srovnání lze učinit závěr, že (2E)-3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ony jsou více nebo méně účinné proti kvasinkám rodu *Candida* a dermatofytu *Trichophyton mentagrophytes*. Jejich účinnost vůči ostatním houbám je zanedbatelná. Fluorované deriváty jsou přibližně stejně účinné jako nesubstituovaný (2E)-3-fenyl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-on.

## 8. Literatura

- 
- <sup>1</sup> Castelli, M. V.; Butassi, E.; Monteiro, M. C.; Svetaz, L. A.; Vicente, F.; Zacchino, S. A. Novel antifungal agents: a patent review (2011 – present). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, *24*, 323–338.
- <sup>2</sup> Jedličková, J. *Systémové mykózy*, 1. vyd.; Farmakoterapie pro praxi; Maxdorf: Praha, 2006; 130 s.
- <sup>3</sup> Łačka, I.; Konieczny, M. T.; Bułakowska, A.; Rzymowski, T.; Milewski, S. Antifungal action of the oxathiolone-fused chalcone derivative. *Mycoses* **2011**, *54*, e407–e414.
- <sup>4</sup> Nowakowska, Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 125–137.
- <sup>5</sup> Opletalová, V.; Šedivý, D. Chalkony a jejich heterocyklické analogy jako potenciální antifungální chemoterapeutika. *Česk. Slov. Farm.* **1999**, *48*, 252–255.
- <sup>6</sup> Opletalová, V.; Hartl, J.; Palát, K. Jr.; Patel, A. Conformation analysis of 2-hydroxy-2',5'-diazachalcones. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *23*, 55–59.
- <sup>7</sup> Batovska, D. I.; Todorova, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2010**, *5*, 1–29
- <sup>8</sup> Kučerová-Chlupáčová, M.; Kuneš, J.; Buchta, V.; Vejsová, M.; Opletalová, V. Novel pyrazine analogs of chalcones: synthesis and evaluation of their antifungal and antimycobacterial activity. *Molecules* **2015**, *20*, 1104–1117.
- <sup>9</sup> Tomšíková, A. *Nosokomiální mykózy*, 1. vyd.; Karolinum: Praha, 2003; 140 s.
- <sup>10</sup> Koďoušek, R. *Mykózy: lékařsky významná mykotická onemocnění člověka*, 1. vyd.; Univerzita Palackého: Olomouc, 2003; 199 s.
- <sup>11</sup> Haber, J.; Jesenská, Z.; Krčméry, V.; Mášová, I. *Systémové mykózy a jejich léčba*, 1. vyd. Galén: Praha, 1995; 320 s.
- <sup>12</sup> Horák, P. Specifická antimykotika a jejich použití u vybraných patologických stavů. *Interní Med.* [online] **2011**, *13*, 171–175. <http://www.internimediceina.cz/pdfs/int/2011/04/06.pdf>(cit. 8. ledna 2016).
- <sup>13</sup> Tomšíková, A. *Mykotická onemocnění u rizikových pacientů*, 1. vyd.; Karolinum: Praha, 1992; 154 s.
- <sup>14</sup> Hibbett, D. S.; Binder, M.; Bischoff, J. F. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **2007**, *111*, 509–547. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0953756207000615>(cit. 8. ledna 2016).
- <sup>15</sup> Kwon-Chug, K. J. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoramycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54* (Suppl. 1), S8–S15. [http://cid.oxfordjournals.org/content/54/suppl\\_1/S8.full.pdf+html](http://cid.oxfordjournals.org/content/54/suppl_1/S8.full.pdf+html)(cit. 8. ledna 2016).
- <sup>16</sup> Houbraeken, J.; Verweij, P. E.; Rijs, A. J. M. M.; Borman, A. M.; Samson, R. A. Identification of *Paecilomyces variotii* in clinical samples and settings. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 2754–2761.

- 
- <sup>17</sup> Alastruey-Izquierdo, A.; Mellado, E.; Peláez, T.; Pemán, J.; Zapico, S.; Alvarez, M.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Cuenca-Estrella, M.; FILPOP Study Group. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 3380–3387.
- <sup>18</sup> Hartl, J. *Farmaceutická chemie IV.*, 1. vyd.; Karolinum: Praha, 2006; 166 s.
- <sup>19</sup> Ketokonazol v perorální formě – EMA doporučuje pozastavení registrace [online]. Státní ústav pro kontrolu léčiv: Praha, 2013. <http://www.sukl.cz/ketokonazol-v-peroralni-forme-ema-doporucuje-pozastaveni>, (cit. 8. ledna 2016).
- <sup>20</sup> Daniel, E.; Newell-Price, J. D. Therapy of endocrine disease: steroidogenesis enzyme inhibitors in Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* **2015**, *172*, 263–280.
- <sup>21</sup> Pasqualotto, A. New and emerging treatments for fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61* (Suppl. 1), i19–i30. [http://jac.oxfordjournals.org/content/61/suppl\\_1/i19.long](http://jac.oxfordjournals.org/content/61/suppl_1/i19.long)(cit. 8. ledna 2016).
- <sup>22</sup> Urbina, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J. Eukaryot. Microbiol.* **2015**, *62*, 149–156.
- <sup>23</sup> U. S. Food and Drug Administration. Drugs@FDA, FDA Approved Drug Products, CRESEMBA [online]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails> (cit. 8. ledna 2016).
- <sup>24</sup> European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMA/CHMP/470149/2015, Cresemba [online]. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion\\_-\\_Initial\\_authorisation/human/002734/WC500190471.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/human/002734/WC500190471.pdf) (cit. 8. ledna 2016).
- <sup>25</sup> GSK. <http://www.gsk-clinicalstudyregister.com/compounds/albaconazole#rs>(cit. 8. ledna 2016)
- <sup>26</sup> Snelders, E.; van der Lee, H. A. L.; Kuijpers, J.; Rijs, A. J. M. M.; Varga, J.; Robert A. Samson, R. A.; Mellado, E.; Donders, A. R. T.; Melchers, W. J. G.; Verweij, P. E. Emergence of azoleristance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* [online] **2008**, *5*, e219. <http://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0050219>(cit. 8. ledna 2016).
- <sup>27</sup> Svetaz, L.; Agüero, M. B.; Alvarez, S.; Luna, L.; Feresin, G.; Derita, M.; Tapia, A.; Zacchino, S. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1074–1080.
- <sup>28</sup> Opletalová, V.; Pour, M.; Kuneš, J.; Buchta, V.; Silva, L.; Kráľová, K.; Meltrová, D.; Peterka, M.; Posledníková, M. Synthesis and biological evaluation of (*E*)-3-(nitrophenyl)-1-(pyrazin-2-yl)prop-2-en-1-ones. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2006**, *71*, 44–58.
- <sup>29</sup> López, S. N.; Castelli, M. V.; Zacchino, S. A.; Domínguez, J. N.; Lobo, G.; Charris-Charris, J.; Corté, J. C. G.; Ribas, J. C.; Devia, C.; Rodríguez, A. M.; Enriz, R. D. In vitro antifungal evaluation and structure–activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 1999–2013.

- 
- <sup>30</sup> Boeck, P.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Filho, V. C.; López, S.; Sortino, M.; Escalante, A.; Ricardo L. E. Furlán, R. L. E.; Zacchino, S. Antifungal activity and studies on mode of action of novel xanthoxyline-derived chalcones. *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2005**, *338*, 87–95.
- <sup>31</sup> Lahtchev, K. L.; Batovska, D. I.; Parushev, S. P.; Ubiyovk, V. M.; Sibirny, A. A. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2220–2228.
- <sup>32</sup> Bitencourt, T. A.; Komoto, T. T.; Massaroto, B. G.; Miranda, C. E. S.; Belebony, R. O.; Marins, M.; Fachin, A. L. *Trans*-chalcone and quercetin down-regulate fatty acid synthase gene expression and reduce ergosterol content in the human pathogenic dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *BMC Complement. Altern. Med.* [online] **2013**, *13*, 229.  
<http://bmccomplementalmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-229> (cit. 8. ledna 2016).
- <sup>33</sup> Li, X.-C.; Joshi, A. S.; ElSohly, H. N.; Jacob, M.R.; Zhang, Z.; Khan, I. A.; Ferreira, D.; Walker, L. A.; Broedel, S. E. Jr.; Raulli, R. E.; Cihlar, R. L. Fatty acid synthase inhibitors from plants: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1909–1914.
- <sup>34</sup> Komoto, T. T.; Bitencourt, T. A.; Silva, G.; Belebony, R. O.; t Marins, M.; Fachin, A. L. Gene expression response of *Trichophyton rubrum* during coculture on keratinocytes exposed to antifungal agents. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* [online] **2015**, 180535.  
<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/180535/> (cit. 8. ledna 2016).
- <sup>35</sup> Fachin, A. L.; Ferreira-Nozawa, M. S.; Maccheroni, W. Jr.; Martinez-Rossi, N. M. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline *N*-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J. Med. Microbiol.* **2006**, *55*, 1093–1099.
- <sup>36</sup> Batovska, D.; Parushev, S.; Slavova, A.; Bankova, V.; Tsvetkova, I.; Ninova, M.; Najdenski, H. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 87–92.
- <sup>37</sup> IUBMB, Glutathione Biosynthesis [online].  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/reaction/AminoAcid/glutathi.html> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>38</sup> IUBMB Enzyme Nomenclature, EC 6.3.2.2 [online].  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC6/3/2/2.html> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>39</sup> IUBMB Enzyme Nomenclature, EC 6.3.2.3 [online].  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC6/3/2/3.html> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>40</sup> IUBMB Enzyme Nomenclature, EC 1.8.1.7 [online].  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/8/1/7.html> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>41</sup> IUBMB Enzyme Nomenclature, EC 2.5.1.18 [online].  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>42</sup> Eaton, D. L.; Bammler, T. K. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci.* **1999**, *49*, 156–164.
- <sup>43</sup> Hayes, J. D.; Flanagan, J. U.; Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 51–88.

- 
- <sup>44</sup> Sheenan, D.; Meade, G.; Foley, V. M.; Catriona A.; Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **2001**, *360*, 1–16.
- <sup>45</sup> Allocati, N.; Federici, L.; Masulli, M.; Di Ilio, C. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS. J.* **2009**, *276*, 58–75.
- <sup>46</sup> Kachadourian, R.; Day, B.J.; Pugazenti, S.; Franklin, C. C.; Genoux-Bastide, E.; Mahaffey, G.; Gauthier, C.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A. Synthetic chalcone as a potent inducer of glutathione biosynthesis. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1382–1388.
- <sup>47</sup> Yao, J.; Zhang, B.; Ge, C.; Peng, S.; Fang, J. Xanthohumol, a polyphenol chalcone present in hops, activating Nrf2 enzymes to confer protection against oxidative damage in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 1521–1531.
- <sup>48</sup> Elliott, A. J.; Scheiber, S. A.; Thomas, C.; Pardini, R. S. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. A structure-activity study. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1603–1608.
- <sup>49</sup> Zhang, K.; Yang, E.-B.; Tang, W.-Y.; Wong, K. P.; Mack, P. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *54*, 1047–1053.
- <sup>50</sup> Zhang K.; Das, N. P. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 2063–2068.
- <sup>51</sup> Wang, Z.; Jin, L.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, A. A novel method for screening the glutathione transferase inhibitors. *BMC Biochem.* [online] **2009**, *10*, 6.  
<http://bmcbiochem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2091-10-6> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>52</sup> Li, X.; Xu, X.; Ji, T.; Liu, Z.; Gu, M.; Hoang, B. H.; Zi, X. Dietary feeding of flavokawain A, a kava chalcone, exhibits a satisfactory safety profile and its association with enhancement of phase II enzymes in mice. *Toxicol. Rep.* **2014**, *1*, 2–11.
- <sup>53</sup> Chang, H. C.; Chen, H.-W.; Tung, H.-S.; Liu, K.-L.; Tsai, C.-W.; CHONG-KUEI Lii, C.-K. Butein up-regulates the expression of the  $\pi$  class of glutathione S-transferase in rat primary hepatocytes through the ERK/AP-1 pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8994–9000.
- <sup>54</sup> Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Croce, F.; Celano, L.; Leonor Thomson, L.; Fernández, M.; Pintos, C.; Raymondo, S.; Bollati, M.; Monge, A.; López de Ceráin, A.; Oscar E. Piro, O. E.; Hugo Cerecetto, H.; González, M. Identification of chalcones as *in vivo* liver monofunctional phase II enzymes inducers *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5391–5399.
- <sup>55</sup> Zhang, K.; Wang, K. P. Inhibition of the efflux of glutathione S-conjugates by plant polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 1631–1638.
- <sup>56</sup> Brechbuhl, H. M.; Gould, N.; Kachadourian, R.; Riekhof, W. R.; Voelker, D. R.; Day, B. J. Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16582–16587.
- <sup>57</sup> Miyamoto, T.; Yamamoto, I. Glutathione conjugates as the activated form of chalcones for glutathione S-transferase inhibition. *J. Pesticide Sci.* **1994**, *19*, 53–58.

- 
- <sup>58</sup> Moskaug, J. Ø.; Carlsen, H.; Myhrstad, M. C. W.; Blomhoff, R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*(Suppl), 277S–283S.
- <sup>59</sup> Cuendet, M.; Guo, J.; Luo, Y.; Chen, S.; Oteham, C. P.; Moon, R. C.; van Breemen, R. B.; Marler, L. E.; Pezzuto, J. M.; Cancer chemopreventive activity and metabolism of isoliquiritigenin, a compound found in licorice. *Cancer Prev. Res. (Phila)* **2010**, *3*, 221–232.
- <sup>60</sup> Dinkova-Kostova, A. T.; Cheah, J.; Samouilov, A.; Zweier, J. L.; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. Phenolic Michael reaction acceptors: combined direct and indirect antioxidant defenses against electrophiles and oxidants. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *3*, 261–268.
- <sup>61</sup> Veal, E. A.; Toone, W. M.; Jones, N.; Morgan, B. A. Distinct roles for glutathione *S*-transferases in the oxidative stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35523–35531.
- <sup>62</sup> Go, M. L.; Wu, X.; Liu, X. L. Chalcones: an update on cytotoxic and chemoprotective properties. *Curr Med Chem.* **2005**, *12*, 481–499.
- <sup>63</sup> Wang, J.; Wang, S.; Song, D.; Zhao, D.; Sha, Y.; Jiang, Y.; Jing, Y.; Cheng, M. Chalcone derivatives inhibit glutathione-S-transferase P1-1 activity: insights into the interaction mode of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2009**, *73*, 511–514.
- <sup>64</sup> Awasthi, S. K.; Mishra, N.; Dixit, S. K.; Singh, A. Yadav, M.; Yadav, S. S.; Rathaur, S. Short report: antifilarial activity of 1,3-diarylpropen-1-one: effect on glutathione-S-transferase, a phase II detoxification enzyme. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *80*, 764–768.
- <sup>65</sup> Łącka, I.; Konieczny, M. T.; Bułakowska, A.; Kodedová, M.; Gašková, D.; Maurya, I. K.; Prasad, R.; Milewski, S. Chemosensitization of multidrug resistant *Candida albicans* by the oxathiolone fused chalcone derivatives. *Front. Microbiol.* [online] **2015**, *6*, 783.  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00783/abstract> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>66</sup> Goh, K.; Chen, Y.; Zheng, L.; Ong, L.; Jin, Y.; Chow, P.; Zhang, K. 2,2'-Dihydroxychalcone, a glutathione transferase inhibitor, sensitises human colon adenocarcinoma cells to chlorambucil and melphalan, but not to actinomycin D. *Mol. Med. Rep.* **2008**, *1*, 575–579.
- <sup>67</sup> Huang, H.-Y.; Niu, J.-L.; Zhao, L.-M.; Yan-hua Lu, Y.-H. Reversal effect of 2,4-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone on multi-drug resistance in resistant human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402/5-FU. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 1086–1092.
- <sup>68</sup> Maras, B.; Angiolella, L.; Mignogna, G.; Vavala, E.; Macone, A.; Colone, M.; Pitari, G.; Stringaro, A.; Dupré, S.; Anna Teresa Palamara, A. T. Glutathione metabolism in *Candida albicans* resistant strains to fluconazole and micafungin. *PLoS One* **2014**, *9*, e98387.  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0098387> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>69</sup> Gales, G.; Penninckx, M.; Block, J.-C.; Leroy P. Role of glutathione metabolism status in the definition of some cellular parameters and oxidative stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* cells growing as biofilms. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 667–675.



- 
- <sup>70</sup> O'Donnell, L. E.; Millhouse, E.; Sherry, L.; Kean, R.; Malcolm, J.; Nile, C. J.; Gordon Ramage, G. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. *FEMS Yeast Res.* [online] **2015**, *15*, fov077. <http://femsyr.oxfordjournals.org/content/15/7/fov077.long> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>71</sup> Muzny, C. A.; Jane R. Schwebke, J. R. Biofilms: an underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 601–606.
- <sup>72</sup> Peralta, M. A.; daSilva, M.A.; Ortega, M. G.; Cabrera, J. L.; Paraje, M. G. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 975–980.
- <sup>73</sup> Onsare, J. G.; Arora, D. S.. Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *118*, 313–325
- <sup>74</sup> Singh, B. N.; Upreti, D. K.; Singh, B. R.; Pandey, G.; Verma, S.; Roy, S.; Naqvi, A. H.; Rawat, A. K. S. Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 2153–2168.
- <sup>75</sup> Sivakumar, P. M.; Prabhawathi, V.; Neelakandan, R.; Doble, M. Chalcone coating on cotton cloth – an approach to reduce attachment of live microbes. *Biomater. Sci.* **2014**, *2*, 990–995.
- <sup>76</sup> Messier, C.; Epifano, F.; Genovese, S.; Grenier, D. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and yeast-hyphal transition by 4-hydroxycordoin. *Phytomedicine* **2011**, *18*, 380–383.
- <sup>77</sup> Messier, C.; Grenier, D. Effect of licorice compounds licochalcone A, glabridin and glycyrrhizic acid on growth and virulence properties of *Candida albicans*. *Mycoses* [online] **2011**, *54*, e801–e806 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0507.2011.02028.x/epdf> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>78</sup> Zanolli, P.; Zavatti, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 383–396.
- <sup>79</sup> Kuete, V.; Metuno, R.; Ngamenib, B.; Tsafack, A. M.; Ngandeu, F.; Fotso, G. W.; Bezabih, M.; Etoa, F.-X.; Ngadjui, B. T.; Abegaz, B. M.; Benga, V. P. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Treculia obovoidea* (Moraceae). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *112*, 531–536.
- <sup>80</sup> Svetaz, L.; Tapia, A.; López, S. N.; Ricardo Furlán, R. L. E.; Petenatti, E.; Pioli, R.; Schmeda-Hirschmann, G.; Susana A. Zacchino, S. A.. Antifungal chalcones and new caffeic acid esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 3297–3300.
- <sup>81</sup> Brandão, G. C.; Kroon E. G.; Duarte, M. G. R.; Braga, F. C.; de Souza Filho, J. D.; de Oliveira, A.B. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 926–929.
- <sup>82</sup> Moshi, M. J.; Joseph, C. C.; Innocent, E.; Nkunya, M. H. H. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of extracts and compounds from *Uvaria scheffleri*. *Pharm. Biol.* **2004**, *42*, 269–273.
- <sup>83</sup> Bhakuni, D. S.; Chaturvedi, R. Chemical constituents of *Crotalaria madurensis*. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 585–591.

- 
- <sup>84</sup> Malhotra, S.; Sharma, V. K.; Parmar, V. S. Synthesis of three new dihydropyrano-chalcones: structural revision of crotmadine, an antifungal constituent of *Crotalaria madurensis*. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 578–581.
- <sup>85</sup> Jayasinghe, L.; Balasooriya, B. A. I. S.; Padmini, W. C.; Noriyuki Hara, N.; Fujimoto, Y. Geranyl chalcone derivatives with antifungal and radical scavenging properties from the leaves of *Artocarpus nobilis*. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1287–1290.
- <sup>86</sup> Mostahar, S.; Alam, S.; Islam, A. Cytotoxic and antimicrobial activities of two new synthetic 2'-oxygenated flavones reported from *Andrographis viscosula*. *J. Serb. Chem. Soc.* **2007**, *72*, 321–329.
- <sup>87</sup> Mishra, P. K.; Sarma, B. K.; Singhai, P. K.; Singh, U. P. Antifungal activity of 2-hydroxy 4,4',6'-trimethoxychalcone. *Mycobiology* **2007**, *35*, 72–75.
- <sup>88</sup> Antinori, S.; Ferraris, L.; Orlando, G.; Tocalli, L.; Ricaboni, D.; Corbellino, M.; Sollima, S.; Galli, M.; Milazzo, L. Fungal endocarditis observed over an 8-year period and a review of the literature. *Mycopathologia* **2014**, *178*, 37–51.
- <sup>89</sup> Bernardeschi, C.; Foulet, F.; Saskia Ingen-Housz-Oro, S.; Ortonne, N.; Sitbon, K.; Quereux, G.; Lortholary, O.; Chosidow, O.; Bretagne, S.; the French Mycosis Study Group. Cutaneous invasive aspergillosis: retrospective multicenter study of the french invasive-aspergillosis registry and literature review. *Medicine (Baltimore)* **2015**, *94(26)*, e1018. [http://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2015/07010/Cutaneous\\_Invasive\\_Aspergillosis\\_\\_Retrospective.22.aspx](http://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2015/07010/Cutaneous_Invasive_Aspergillosis__Retrospective.22.aspx) (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>90</sup> López, A.; Ming, D. S.; Towers, G. H. N. Antifungal activity of benzoic acid derivatives from *Piper lanceaefolium*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 62–64.
- <sup>91</sup> Kuete, V.; Sandjo, L. P. Isobavachalcone: an overview. *Chin. J. Integr. Med.* **2012**, *18*, 543–547.
- <sup>92</sup> Kuete, V.; Noumedem, J. A. K.; Nana, F. Chemistry and pharmacology of 4-hydroxy lonchocarpin: a review. *Chin. J. Integr. Med.* **2013**, *19*, 475–480.
- <sup>93</sup> Suman, S.; Singh, R.; Malik, M. S.; Kathpal, T. S.; Malik, O. P. Synthesis and antifungal activity of 1,3-bis(4-methyl/4-bromo/3-nitrophenyl)propan-1,3-diones and their 2-[(4-bromo/4-chloro/2-nitro/2-ethoxy/2,4-dichlorophenyl)azo]analogs. *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1995**, *34*, 743–746.
- <sup>94</sup> Adokar, M. R. Synthesis and green bromination of some chalcones and their antimicrobial screening. *Int. Res. J. Pharm.* **2013**, *4(4)*, 194–196.
- <sup>95</sup> Yin, B.-T.; Yan, C.-Y.; Peng, X.-M.; Zhang, S.-L.; Rasheed, S.; Geng, R.-X.; Cheng-He Zhou, C.-H. Synthesis and biological evaluation of  $\alpha$ -triazolyl chalcones as a new type of potential antimicrobial agents and their interaction with calf thymus DNA and human serum albumin. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *71*, 148–159.
- <sup>96</sup> Hasan, A.; Rasheed, L.; Malik, A. Synthesis and characterization of variably halogenated chalcones and flavonols and their antifungal activity. *Asian J. Chem.* **2007**, *19*, 937–948.

- 
- <sup>97</sup> Karthikeyan, M. S.; Holla, B. S.; Kumari, N. S. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorine containing hydroxy pyrazolines. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 30–36.
- <sup>98</sup> Prasad, Y. R., Rao, A. L.; Rambabu, R. Synthesis and antimicrobial activity of some chalcone derivatives. *E-J. Chem.* [online] **2008**, *5*, 461–466.  
<http://www.hindawi.com/journals/jchem/2008/876257/abs/> (cit. 8. ledna 2016)
- <sup>99</sup> Tiwari, B.; Pratapwar, A. S.; Tapas, A. R.; Butle, S. R.; Vatkar, B. S. Synthesis and antimicrobial activity of some chalcone derivatives. *Int. J. Chem. Tech. Res.* **2010**, *2*, 499–503.
- <sup>100</sup> Tomar, V.; Bhattacharjee, G.; Kamaluddin, Kumar, A. Synthesis and antimicrobial evaluation of new chalcones containing piperazine or 2,5-dichlorothiophene moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5321–5324.
- <sup>101</sup> Nowakowska, Z.; Kędzia, B.; Schroeder, G. Synthesis, physicochemical properties and antimicrobial evaluation of new (*E*)-chalcones. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 707–713.
- <sup>102</sup> Hussain, T.; Siddiqui, H. L.; Zia-ur-Rehman, M.; Yasinzai, M. M.; Parvez, M. Anti-oxidant, anti-fungal and anti-leishmanial activities of novel 3-[4-(1*H*-imidazol-1-yl)phenyl]prop-2-en-1-ones. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4654–4660.
- <sup>103</sup> Karaman, I.; Gezegen, H.; Gürdere, M. B.; Dingil, A.; Ceylan, M. Screening of biological activities of a series of chalcone derivatives against human pathogenic microorganisms. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 400–408.
- <sup>104</sup> Raj, C. G. D.; Sarojini, B. K.; Hegde, S.; Sreenivasa, S.; Ravikumar, Y. S.; Bhanuprakash, V.; Revanaiah, Y.; Ragavendra, R. *In vitro* biological activities of new heterocyclic chalcone derivatives. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 2079–2087.
- <sup>105</sup> Kumar, C. S. C.; Loh, W.-S.; Ooi, C. W.; Quah, C. K.; Fun, H.-K. Heteroaryl Chalcones: Design, synthesis, X-ray crystal structures and biological evaluation. *Molecules* [online] **2013**, *18*, 12707–12724.  
<http://www.mdpi.com/1420-3049/18/10/12707> (cit. 8. ledna 2016).
- <sup>106</sup> Ritter, M.; Martins, R. M.; Rosa, S. A.; Malavolta, J. L.; G. Lund, R. G.; Flores, A. F. C.; Pereira, C. M. P. Green synthesis of chalcones and microbiological evaluation. *J. Braz. Chem. Soc.* **2015**, *26*, 1201–1210.
- <sup>107</sup> Konieczny, M. T.; Wojciech Konieczny, W.; Sabisz, M.; Skladanowski, A.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. Synthesis of isometric, oxathiolone fused chalcones, and comparison their activity towards various microorganisms and human cancer cells line. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *57*, 817–820.
- <sup>108</sup> Konieczny, M. T.; Wojciech Konieczny, W.; Sabisz, M.; Skladanowski, A.; Wakieć, R.; Augustynowicz-Kopeć, E.; Zwolska, Z. Acid-catalyzed synthesis of oxathiolone fused chalcones. Comparison of their activity toward various microorganisms and human cancer cells line. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 729–733.
- <sup>109</sup> De Carvalho Tavares, L.; Johann, S.; Maria de Almeida Alves, T.; Guerra, J. C.; Maria de Souza-Fagundes, E.; Cisalpino, P. S.; Bortoluzzi, A. J.; Caramori, G. F.; de Mattos Piccoli, R.; Braibante, H. S. T.; Braibante, M. E. F.; Pizzolatti, M. G. Quinolinylnyl and quinolinylnyl *N*-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4448–4456.

- 
- <sup>110</sup> De Sá, N. P.; Cisalpino, P. S.; de Carvalho Tavares, L.; Espíndola, L.; Pizzolatti, M. G.; Santos, P. C.; de Paula, T. P.; Rosa, C. A.; de Souza Dda, G.; Santos, D. A.; Johann, S. Antifungal activity of 6-quinolinyl *N*-oxide chalcones against *Paracoccidioides*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 841–845.
- <sup>111</sup> Rizvi, S. U.; Siddiqui, H. L.; Parvez, M.; Ahmad, M.; Siddiqui, W. A.; Yasinzai, M. M. Antimicrobial and antileishmanial studies of novel (2*E*)-3-(2-chloro-6-methyl/methoxyquinolin-3-yl)-1-(aryl)prop-2-en-1-ones. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 301–306.
- <sup>112</sup> Marrugo-González, A. J.; Orlov, V. D.; Fernandez-Maestre, R. Synthesis of 8-hydroxyquinoline chalcones: trans configuration, intramolecular hydrogen bonds, and antifungal activity. *J. Chil. Chem. Soc.* **2012**, *57*, 1287–1291.
- <sup>113</sup> Prasath, R.; Bhavana, P.; Sarveswari, S.; Ng, S. W.; Tiekink, E. R. T. Efficient ultrasound-assisted synthesis, spectroscopic, crystallographic and biological investigations of pyrazole-appended quinolinyl chalcones. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1081*, 201–210.
- <sup>114</sup> Liaras, K.; Geronikaki, A.; Glamočlija, J.; Ćirić, A.; Soković, M. Thiazole-based chalcones as potent antimicrobial agents. Synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 3135–3140.
- <sup>115</sup> Liaras, K.; Geronikaki, A.; Glamočlija, J.; Ćirić, A.; Soković, M. Novel (*E*)-1-(4-methyl-2-(alkylamino)thiazol-5-yl)-3-arylprop-2-en-1-ones as potent antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7349–7356.
- <sup>116</sup> Opletalová, V.; Hartl, J.; Patel, A.; Palát K. Jr.; Buchta, V. Ring substituted 3-phenyl-1-(2-pyrazinyl)-2-propen-1-ones as potential photosynthesis-inhibiting, antifungal and antimycobacterial agents. *Farmaco* **2002**, *57*, 135–144.
- <sup>117</sup> Chlupáčová, M.; Opletalová, V.; Kuneš, J.; Silva, L.; Buchta, V.; Dušková, L.; Kráľová, K. Synthesis and biological evaluation of (*E*)-3-aryl-1-pyrazin-2-ylprop-2-en-1-ones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2005**, *33*, 31–43.
- <sup>118</sup> Opletalová, V.; Patel, A.; Boulton, M.; Dundrová, A.; Lacinová, E.; Převorová, M.; Appeltauerová, M.; Coufalová, M. 5-Acetyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-alkyl-2-pyrazinecarbonitriles and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic intermediates for antiinflammatory agents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1093–1101.
- <sup>119</sup> Kučerová-Chlupáčová, M.; Opletalová, V.; Jampílek, J.; Doležel, J.; Dohnal, J.; Pour, M.; Kuneš, J.; Voříšek, V. New hydrophobicity constants of substituents in pyrazine rings derived from RP-HPLC study. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2008**, *73*, 1–18.
- <sup>120</sup> Zámocká J.; Dvořáčková, D.; Heger, J. Darstellung und Strukturbestimmung einiger Diazachalcone. *Z. Chem. (Stuttgart, Ger.)* **1980**, *20*, 29–30.
- <sup>121</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard*, CLSI document M27-A3, 3rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008.

- 
- <sup>122</sup> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard*, CLSI Document M38-A2, 2nd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2008.
- <sup>123</sup> Gupta, A. K.; Kohli, Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and *in vitro* evaluation of combination antifungal activity. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *149*, 296–305.
- <sup>124</sup> Opletalová, V. nepublikované výsledky
- <sup>125</sup> Chlupáčová, M. Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva. Disertační práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta. Hradec Králové 2006, 182 s.
- <sup>126</sup> Tyllová, V. Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva VIII. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta. Hradec Králové 2008, 47 s.
- <sup>127</sup> Peterka, M. Chalkony a jejich analogy jako potenciální léčiva I. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta. Hradec Králové 2000, 48 s.