

# Ocena cytotoksycznego działania fungicydów o budowie benztioanilidów

AGNIESZKA MUZYCZUK-PIEKARSKA, HALINA KOWALSKA-PYLKA,  
WOJCIECH CYBULSKI, WOJCIECH RZESKI\*

Zakład Toksykologii i Ochrony Środowiska Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych  
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\*Zakład Wirusologii i Immunologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Muzyczuk-Piekarska A., Kowalska-Pylka H., Cybulski W., Rzeski W.

## Evaluation of the cytotoxic effect of fungicides with benzthioanilide structure

### Summary

The acute cytotoxic effect of fungicidal preparations derived from benzthioanilides moiety compound was estimated by NRU-, KB- and MTT-tests carried out in model experiments within rat hepatocyte cultures. The results of the study indicate the lowest activity in one chloride ortho-substituted 2,4-dihydroxy-2-chlorobenzthioanilide in the aniline ring. The next in order of toxicity were 2,4-dihydroxy-2,5-dichlorobenzthioanilide (two chloride substituted compound) and 2,4-dihydroxy-2-carboxymethylbenzthioanilide, followed by 2,4-dihydroxybenzthioanilide (without substituted groups). 2,4-dihydroxy-2,4,5-trichlorobenzthioanilide with three chloride substitutions in the aniline ring turned out to be most toxic. In addition, a correlation of the results from experiments carried out in vitro with the LD50 data from literature for the same derivatives of 2,4-dihydroxybenzthioanilide was confirmed.

**Keywords:** benzthioanilides, fungicides, cytotoxicity, hepatocytes

Choroby grzybicze ludzi i zwierząt występują na całym świecie, z tym, że wrażliwość na zakażenie jest zróżnicowana i zależy od wieku, warunków środowiskowych oraz statusu immunologicznego. Szczególnie predysponowane do zakażeń grzybiczych są osoby lub zwierzęta, u których dochodzi do upośledzenia odporności na skutek stosowania, między innymi, terapii steroidowej, chemioterapii nowotworowej, antybiotyków o szerokim spektrum działania, leków immunosupresyjnych (transplantacje) lub niedoboru immunologicznego spowodowanego zakażeniami wirusem FIV u kotów i HIV u człowieka oraz innych zakażeń wirusowych (10).

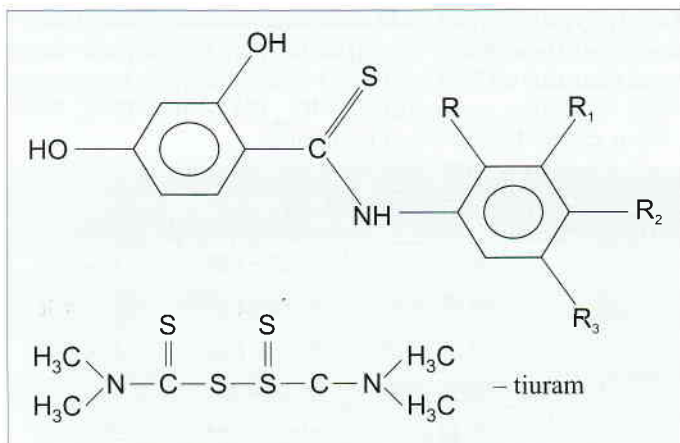
Do podawanych doustnie, stosowanych już w latach pięćdziesiątych, antybiotyków polienowych: nystatyny, natamycyny, amfoterycyny B i antybiotyku niepolienowego, gryzeofulwiny, doszły w ostatnim dwudziestopięcioleciu leki syntetyczne należące do podstawowych grup farmakologicznych, tj. azoli, alliloamin, morfolin oraz pochodnych fluoropirydyny i pirydynonu. Przykładami aktualnie stosowanych leków tych grup są: klotrimazol, mikonazol, ekonazol, bifonazol, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, naftifina, terbinafina, amorolfina, 5-fluorocytozyna, cyklopiroks.

Ostatnio w poszukiwaniu nowych związków o działaniu przeciwgrzybiczym otrzymano, między innymi, pochodne: imidazolo[2, 1-c][1, 2, 4] triazolu (35),

2-benzyltio-4-karbotioamidów (17), 4-(benzylsulfanyl)-pirymidynowe (18), 3-fenyl-5-metyl-2H, 5H-furan-2-onu (31) oraz pochodne tiazolinyltetrahydrobenzo[b]tiofenowe i tiazolinyltetrahydrobenzo[2, 3-d]pyrimidyno-4-onowe (1). Ponadto opracowano nową grupę związków 1, 3, 4-tiadiazolu (25). Wymienione preparaty poddawane są obecnie określonym badaniom biologicznym.

W ostatnich latach nagromadziło się również sporo informacji dotyczących aktywności biologicznej modyfikowanych w N-pierścieniu 2, 4-dihydroksybenzthioanilidów (19, 22, 26-29). Dane z piśmiennictwa wskazują, że benzthioanilidy należą do związków o szerokim spektrum aktywności biologicznej. Charakteryzują się działaniem chwastobójczym i owadobójczym (37), większość z nich wykazuje również działanie bakteriobójcze (15, 36, 38), natomiast niektóre – grzybobójcze (22, 26-28).

Anilidy działają w organizmie jako niespecyficzne inhibitory blokujące mitochondrialne procesy oddechowe, co stwierdzono, prowadząc badania *Trichophyton rubrum* i *Trichophyton mentagrophytes* (36-38). Ponadto niektóre pochodne anilidów ograniczają dodatkowo procesy utleniania kwasu mlekowego, jabłkowego i fumarowego, doprowadzając do zaburzenia tempa utleniania glukozy u *Candida albicans* (9).



Ryc. 1. Strukturalny wzór ogólny preparatów 2, 4-dihydroksybenzthioanilidowych oraz tiuramu – związku użytego w celu porównawczym

Wybiórcza toksyczność anilidów wobec grzybów i innych drobnoustrojów wiąże się z podatnością na działanie specyficznych enzymów błonowych katalizujących reakcje rozpadu wiązania amidowego. Reakcja hydrolytycznego rozpadu większości związków z tej grupy prowadzi do uwalniania aniliny lub jej pochodnych, które w różnym stopniu i ze zmienną szybkością ulegają przemianom detoksykacyjnym (8).

Badania prowadzone nad właściwościami fizykochemicznymi i aktywnością biologiczną wykazały, że wprowadzenie hydroksy-aromatycznego ugrupowania tioacylowego wpływa na fazową orientację związków i ich zdolność specyficznej penetracji białkowo-lipidowych struktur błon i ścian komórki (29).

Doświadczenia wykonane na szczepach referencyjnych i szczepach bezpośrednio wyizolowanych z materiału klinicznego wykazały aktywność fungistatyczną tych związków wobec dermatofitów: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton gallinae*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton flocculosum* I i II, grzybów drożdżopodobnych: *Candida albicans*, *Candida albicans* ATCC1 0231, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum candidum*, *Trichosporon cutaneum* i *Trichosporon sp.* oraz pleśni: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.*, *Scopulariopsis brevicalis*. W zależności od typu podstawnika 2,4-dihydroksybenzthioanilidy charakteryzują się różną aktywnością przeciwgrzybiczną (22, 27, 28).

Liczni autorzy sugerują, że anilidy należą do związków mało toksycznych dla organizmów stałocieplnych z uwagi na trwałość połączenia aniliny z pierścieniem aromatycznym (8, 24, 33). Jednakże w zależności od wprowadzonego pierścienia

i grup chemicznych różnią się działaniem toksycznym. Z tego względu każdy nowo syntetyzowany związek z tej grupy musi podlegać ocenie toksykologicznej.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie odpowiedzi, czy zastosowany *in vitro* model badawczy może być pomocny we wstępnej ocenie toksyczności ostrej pochodnych 2,4-dihydroksybenzthioanilidów; sprawdzenie wiarygodności i zgodności wyników uzyskanych w testach *in vitro* z wynikami badań  $LD_{50}$  *in vivo* (16).

## Materiały i metody

Do badań zastosowano 2,4-dihydroksybenzthioanilidy wykorzystywane w uprzednio prowadzonych doświadczeniach (20, 24, 37, 38) oraz powszechnie stosowany związek grzybobójczy – tiuram. Strukturę badanych związków przedstawiono w tab. 1.

Badania cytotoksyczne wykonano, stosując linię komórkową hepatocytów szczurzych FAO sprowadzoną z European Collection of Cell Cultures (ECACC Salisbury, Wiltshire, UK).

Hodowlę hepatocytów przechowywano w ciekłym azocie w podłożu liofilizowanym z dodatkiem 10% dimetylosulfotlenku, DMSO, (POCh Gliwice). Po rozmrożeniu przeniesiono komórki z ampułki do plastikowej butelki (Falcon 75 cm<sup>2</sup>) i zawieszono w 20 ml podłoża hodowlanego Hamsa F12 (w modyfikacji Coonsa) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej, FBS, (Sigma), 100 j/ml penicyliny (Sigma) oraz 100 µg/ml streptomycyny (Sigma). Po 24-godzinnej inkubacji w cieplarni w temperaturze 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub> usunięto podłoże, a następnie dodano do hodowli równoważną ilość świeżego podłoża hodowlanego. Po uzyskaniu jednolitej warstwy (monolayer) komórki odklejono od ścianek butelki, stosując 5 ml 0,25% roztworu trypsyno-wersenianu (Sigma). Zawieszono je ponownie w podłożu hodowlanym z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydlęcej. Zawiesinę o gęstości  $2,5 \times 10^5$  hepatocytów/ml podłoża rozlano do plastikowych płytek (Nunc, 96 well) po 100 µl/studzienkę, po czym inkubowano 24 godziny w cieplarni w opisanych warunkach. Tak przygotowane komórki wątroby stosowano w prowadzonych badaniach.

Rozcieńczenia badanych substancji przygotowywano bezpośrednio przed wykonaniem doświadczenia. W tym celu rozpuszczano je w stężonym DMSO (0,5 ml) i podłożu hodowlanym, w którym obniżono stężenie FBS do 2%, otrzymując zawartość preparatu 25 mg w 100 ml pożywki

Tab. 1. Nazwy chemiczne, wzory sumaryczne, masy cząsteczkowe i podstawniki preparatów 2, 4-dihydroksybenzthioanilidowych oraz tiuramu – związku użytego w celu porównawczym

Nr preparatu	Nazwa	Wzór sumaryczny i masa cząsteczkowa	Podstawniki
1	2,4-dihydroksybenzthioanilid	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S 245,30	R - R <sub>3</sub> = H
2	2,4-dihydroksy-2'-chlorobenzthioanilid	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> ClNO <sub>2</sub> S 279,74	R = Cl; R <sub>1</sub> - R <sub>3</sub> = H
3	2,4-dihydroksy-2',5'-dichlorobenzthioanilid	C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> S 314,19	R = R <sub>3</sub> = Cl; R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> = H
4	2,4-dihydroksy-2'-karboksymetylbenzthioanilid	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S 303,34	R <sub>1</sub> = CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ; R, R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = H
5	2,4-dihydroksy-2',4',5'-trichlorobenzthioanilid	C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> S 348,69	R = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = Cl; R <sub>1</sub> = H
6	disulfid tetrametylotiuramu (tiuram)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> 208,30	

Tab. 2. Cytotoksyczny efekt działania pochodnych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów i związku użytego w celu porównawczym (tiuram) na linii komórkowej hepatocytów szczurzych FAO, wyrażony w wartościach  $IC_{50}$  dla testów MTT, NRU i KB w czasie 24-godzinnej inkubacji

Preparat	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	MTT	NRU	KB
1	44,03 $\pm$ 2,16	45,66 $\pm$ 1,53	45,94 $\pm$ 3,80
2	56,54 $\pm$ 1,51	56,85 $\pm$ 1,14	56,07 $\pm$ 1,91
3	44,74 $\pm$ 1,43	45,10 $\pm$ 1,40	45,10 $\pm$ 1,11
4	43,56 $\pm$ 1,22	44,08 $\pm$ 1,96	45,00 $\pm$ 1,60
5	21,24 $\pm$ 0,38	20,89 $\pm$ 0,42	21,65 $\pm$ 0,37
Tiuram	2,38 $\pm$ 0,17	2,68 $\pm$ 0,14	2,79 $\pm$ 0,12

Objaśnienia: Warunki i sposób wykonania podano w rozdziale Materiały i metody. Wartości  $IC_{50}$  przedstawiono jako średnią  $\pm$  SD (n = 8) oznaczone w mikropłytkach przy zastosowaniu czytnika Molecular Devices E max dla metod MTT, NRU i KB

(końcowe stężenie DMSO 0,5%). Z roztworu podstawowego sporządzano roztwory robocze o pożądanym stężeniu, stosując do rozcieńczenia podłoże hodowlane. Po usunięciu podłoża hodowlanego do studzienek mikropłytki wprowadzano (różne stężenia; – 8 powtórzeń na każde stężenie) po 100  $\mu\text{l}$  podłoża z testowaną substancją przygotowaną w opisany sposób. Po upływie 24 i 48 godzin inkubacji w temp. 37°C, w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  hodowle poddano ocenie w zakresie działania cytotoksycznego w oparciu o następujące testy:

- aktywności dehydrogenazy bursztynianowej – zdolność metaboliczna mitochondriów (MTT), INVITOX 17 (14),
- wychwytu czerwieni obojętnej (NRU) – ocena integralności błon komórkowych, INVITOX 54, 1992 (13),
- poziomu całkowitego białka komórkowego (KB) – zdolność proliferacji, INVITOX 3b, 1992 (12).

Pomiary przeprowadzono w automatycznym czytniku mikropłytek E-max (Molecular Devices, Corporation, Menlo Park, Ca, USA), odpowiednio przy długości fali  $\lambda = 570, 550$  i  $600 \text{ nm}$ . Na podstawie uzyskanych wyników określono stężenia badanych substancji, które powodowały spadek o 50% ( $IC_{50}$ ) aktywności cytotoksycznej w porównaniu z próbą kontrolną.

Analizę statystyczną wyników wykonano w oparciu o program komputerowy Statistica 6.0. Przeprowadzono analizę ogólną wyznaczoną metodą dwuczynnikowej analizy wariancji oraz analizę szczegółową stosując test Tukeya i ANOVA.

## Wyniki i omówienie

Do wstępnej weryfikacji wyników badań wykorzystano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA), która wykazała na poziomie ufności  $p \leq 0,05$  statystycznie istotne różnice między niektórymi preparatami przy braku istotnych różnic między poszczególnymi metodami.

Na podstawie szczegółowej analizy porównań średnich wartości dawki toksycznej testem Tukeya nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami  $IC_{50}$  ( $p \leq 0,05$ ) preparatów 2,4-dihydroksybenztioanilidu (preparat 1), 2,4-dihydroksy-2',5'-

Tab. 3. Cytotoksyczny efekt działania pochodnych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów i związku użytego w celu porównawczym (tiuram) na linii komórkowej hepatocytów szczurzych FAO, wyrażony w wartościach  $IC_{50}$  dla testów MTT, NRU i KB w czasie 48-godzinnej inkubacji

Preparat	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )		
	MTT	NRU	KB
1	45,46 $\pm$ 1,40	46,27 $\pm$ 1,92	48,53 $\pm$ 3,25
2	57,17 $\pm$ 1,62	57,95 $\pm$ 1,30	58,81 $\pm$ 4,06
3	45,91 $\pm$ 1,85	46,39 $\pm$ 2,23	47,65 $\pm$ 1,03
4	41,92 $\pm$ 0,84	40,09 $\pm$ 3,14	40,01 $\pm$ 3,21
5	21,62 $\pm$ 0,52	21,54 $\pm$ 0,84	21,05 $\pm$ 0,47
Tiuram	1,95 $\pm$ 0,23	1,72 $\pm$ 0,15	1,71 $\pm$ 0,25

-dichlorobenztioanilidu (preparat 3) i 2,4-dihydroksy-2'-karboksymetylbenztioanilidu (preparat 4) po 24-godzinnej inkubacji w temp. 37°C, w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  z użyciem linii hepatocytów szczurzych FAO stosując testy MTT, NRU i KB.

Dla dwóch pozostałych związków analiza wykazała istotność różnic pomiędzy wartościami dawki toksycznej ( $IC_{50}$ ) we wszystkich wymienionych metodach (tab. 2). W miarę wydłużania czasu inkubacji komórek w temp. 37°C, w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$  do 48 godzin z badanymi związkami wartości  $IC_{50}$  preparatu 4 i tiuramu malały, podczas gdy dla pozostałych badanych związków wartości  $IC_{50}$  nie różniły się istotnie w porównaniu z wynikami stwierdzonymi w czasie 24-godzinnej inkubacji komórek wątroby z pochodnymi 2, 4-dihydroksybenztioanilidów. W związku z tym pomiędzy wartościami  $IC_{50}$  we wszystkich stosowanych testach po 48 godzinnej ekspozycji stwierdzono statystycznie istotne różnice między preparatami 1 i 3 a związkiem 4 (tab. 3).

Na podstawie otrzymanych wyników preparaty 1 i 3, dla których wszystkie testy po 24 i 48 godzinach inkubacji (temp. 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  nie różniły się statystycznie istotnie zakwalifikowano do tej samej grupy związków o podobnej, niskiej cytotoksyczności. Do tej grupy zaliczono również preparat 4, mimo że po 48-godzinnym działaniu na komórki wątroby jego toksyczność nieznacznie wzrastała. Jednakże stężenie toksyczne było najbliższe wartościom  $IC_{50}$  dla poprzednio wymienionych związków.

Najmniej toksyczny okazał się preparat 2, dla którego stwierdzono najwyższe wartości  $IC_{50}$  we wszystkich testach. Natomiast najwyższą toksyczność z pochodnych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów wykazywał preparat 5, zawierający 3 podstawniki chlorowe i fungicyd tiuram, o czym świadczyły najniższe wartości  $IC_{50}$  oznaczone na hepatocytach przy użyciu trzech zastosowanych testów.

Otrzymane wartości  $IC_{50}$  porównano ze wskaźnikami  $LD_{50}$  (tab. 4) oznaczonymi dla czterech pochod-

nych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów (16). Jak wynika z tabeli 4, podobnie jak w warunkach *in vitro*, największe działanie toksyczne mierzone wskaźnikiem LD<sub>50</sub> wykazywał preparat 5. Preparaty 3 i 4 charakteryzowały się zbliżoną toksycznością, natomiast najniższą wartość LD<sub>50</sub> stwierdzono dla preparatu 2.

Zgodnie z przyjętymi zaleceniami cytotoxyczność podstawową bada się najczęściej na niewyspecjalizowanych komórkach i liniach komórkowych, takich jak mysie fibroblasty płodowe 3T3 lub fibroblasty płuc chomika chińskiego (40).

W wybranym do tej pracy układzie doświadczalnym zastosowano linię ciągłą hepatocytów szczura. Komórki te stanowią nie tylko dobry model do oceny działania cytotoxycznego substancji chemicznych (21, 30, 39), ale również, jak wykazali inni autorzy, są przydatne do badań przesiewowych określających działanie hepatotoksyczne (3, 7, 20) oraz procesów biotransformacji (6, 23).

Obok wyboru odpowiedniego modelu komórek do prawidłowej interpretacji wyników bardzo istotny jest

Tab. 4. Wartości LD<sub>50</sub> (mg/kg m.c.) oznaczone na szczurach po podaniu *per os* podstawionych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów (16) i związku użytego w celu porównawczym – tiuram

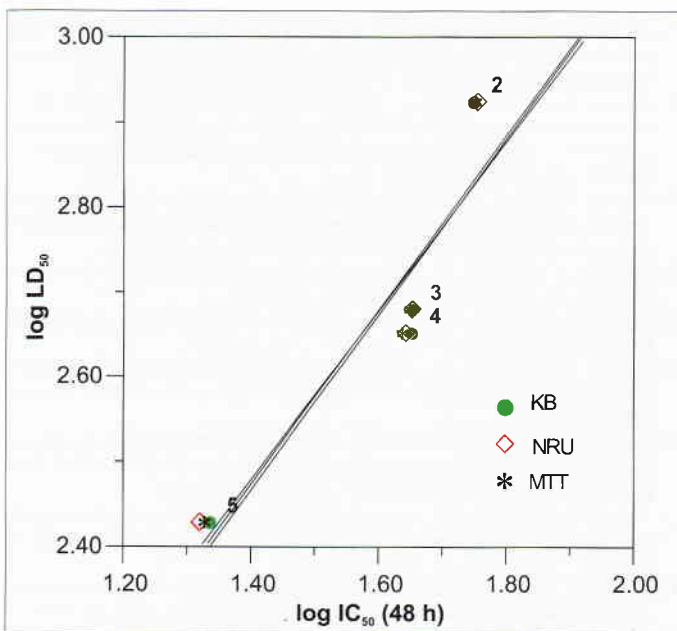
Preparat	LD <sub>50</sub>
1	–*
2	840,5
3	478,1
4	448,4
5	268,3
Tiuram	865,0

Objaśnienia: \* brak danych

dobór czułych testów, które pozwalają nie tylko na stwierdzenie działania cytotoxycznego, ale wskazują również, na które elementy subkomórkowe działają badane ksenobiotyki, np.: test z czerwienią obojętną identyfikuje związki działające na lizosomy (2, 4), test redukcji MTT pozwala na ocenę funkcji mitochondriów (4, 11). Wśród testów stosowanych do oceny cytotoxyczności podstawowej, jak wykazały międzynarodowe programy badawcze, najwyższy stopień walidacji i standaryzacji osiągnęły testy NRU (2, 4, 44) i KB (5, 32). Według Starka i wsp. (34), bardzo ważną rzeczą w ocenie przydatności testów *in vitro* jest uzyskanie zgodności wyników pomiędzy poszczególnymi testami. Taką zgodność w ocenie cytotoxyczności podstawionych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów uzyskano stosując wybrane wskaźniki: test wiązania czerwieni obojętnej w matrix lizosomów (test NRU), oznaczenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (test redukcji MTT) oraz zdolności proliferacji komórek – pomiar stężenia całkowitego białka komórkowego (test KB).

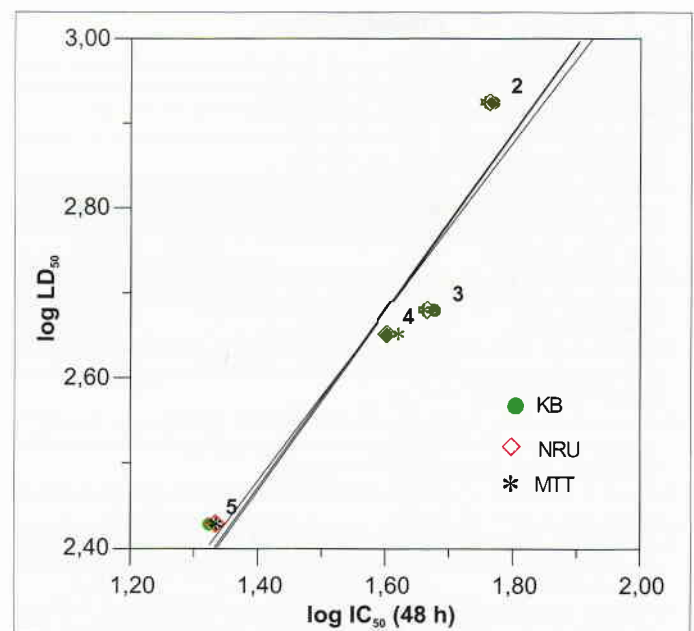
Otrzymane wyniki przedstawione w postaci wartości dawki, która powodowała specyficzny efekt toksyczny obniżenia o 50% (IC<sub>50</sub>) badanych parametrów wskazują na cytotoxyczne działanie preparatów. Jest ono zależne od izomerii i budowy przestrzennej związków (9, 23).

Na podstawie analizy wyników badań cytotoxyczności ostrej pochodnych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów przeprowadzonej z zastosowaniem komórek wątroby i testów MTT, NRU i KB, uzupełnionych dany-



Ryc. 2. Wykres korelacji pomiędzy log LD<sub>50</sub> oznaczonej na szczurach (16) z logarytmicznie przekształconymi wartościami IC<sub>50</sub> dla metod MTT, NRU i KB w czasie 24-godzinnej ekspozycji hepatocytów na działanie badanych związków

Objaśnienia:  
 $\log LD_{50} = 0,997 \log IC_{50} \text{ NRU} + 1,083$  (n = 4, r = 0,928, s = 0,093) (1)  
 $\log LD_{50} = 1,034 \log IC_{50} \text{ KB} + 1,018$  (n = 4, r = 0,921, s = 0,097) (2)  
 $\log LD_{50} = 1,028 \log IC_{50} \text{ MTT} + 1,033$  (n = 4, r = 0,933, s = 0,089) (3)



Ryc. 3. Wykres korelacji pomiędzy log LD<sub>50</sub> oznaczonej na szczurach (16) z logarytmicznie przekształconymi wartościami IC<sub>50</sub> dla metod MTT, NRU i KB w czasie 48-godzinnej ekspozycji hepatocytów na działanie badanych preparatów

Objaśnienia:  
 $\log LD_{50} = 1,045 \log IC_{50} \text{ NRU} + 1,007$  (n = 4, r = 0,950, s = 0,078) (1)  
 $\log LD_{50} = 0,995 \log IC_{50} \text{ KB} + 1,086$  (n = 4, r = 0,944, s = 0,093) (2)  
 $\log LD_{50} = 1,051 \log IC_{50} \text{ MTT} + 0,996$  (n = 4, r = 0,942, s = 0,084) (3)

mi piśmiennictwa z zakresu aktywności grzybobójczej można stwierdzić, co następuje:

1. Zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* najmniejsze działanie cytotoksyczne wykazuje 2, 4-dihydroksi-2'-chlorobenztioanilid (preparat 2) z jednym atomem chloru w położeniu -orto w pierścieniu aniliny, następnie preparaty 2, 4-dihydroksi-2', 5'-dichlorobenztioanilid (preparat 3) z dwoma atomami tego pierwiastka, 2, 4-dihydroksi-2'-karboksymetylbentioanilid z grupą karboksymetylową (preparat 4) i 2, 4-dihydroksybenztioanilid (preparat 1) bez podstawników. Natomiast najbardziej toksyczny jest 2, 4-dihydroksi-2', 4', 5'-trichlorobenztioanilid (preparat 5) z trzema podstawnikami chloru w pierścieniu aniliny.

2. Wprowadzenie do pierścienia aniliny jednego atomu chloru w położeniu -orto zmniejsza cytotoksyczność, ale nie zwiększa aktywności biologicznej (27), natomiast dwóch atomów chloru lub grupy karboksymetylowej powoduje wzrost aktywności biologicznej w stosunku do większości badanych dermatofitów, niektórych pleśni i większości drożdży. Obecność trzech atomów chloru zwiększa aktywność biologiczną w stosunku do wszystkich patogenów (22, 27, 28).

3. Stwierdzono zgodność wyników uzyskanych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* (16) dla wszystkich badanych pochodnych 2, 4-dihydroksybenztioanilidów.

4. Na szczególną uwagę zasługuje 2, 4-dihydroksi-2', 4', 5'-trichlorobenztioanilid o szerokim spektrum aktywności przeciwgrzybiczej (28), znacznie poniżej działania toksycznego.

## Piśmiennictwo

1. *Aboulwata O. M., Ismail K. A., Koreish E. A.*: Synthesis and antimicrobial activity of some thiazoliny tetrahydrobenzo [b] tiophenes and thiazoliny tetrahydrobenzothieno [2, 3-ol] pyrimidin-4-ones. *Il Farmaco* 1992, 47, 631-642.
2. *Babich H., Borenfreund E.*: Applications of the neutral red cytotoxicity assay in vitro toxicology. *ATLA* 1990, 18, 129-144.
3. *Berry M. N., Edwards A. M., Barritt G. J.*: Assessment of integrity of isolated hepatocytes. [w:] *Isolated Hepatocytes. Preparation, Properties and Applications*. Burdon R. H., van Knippenberg P. H. (red.) Elsevier Science Publishers B. V., New York 1991, s. 83.
4. *Borenfreund E., Babich H., Martin-Alguacil N.*: Comparison of two in vitro cytotoxicity assays-the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol. Vitro* 1988, 2, 1-6.
5. *Clothier R. H., Atkinson K. A., Garle M. J., Ward R. K., Willshaw A.*: The development and evaluation of in vitro tests by the FRAME alternatives laboratory. *ATLA* 1995, 23, 75-90.
6. *De Smet K., Brüning T., Blaszkiewicz M., Bolt H. M., Vercautse A., Rogiers V.*: Biotransformation of trichloroethylene in collagen gel sandwich cultures of rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* 2000, 74, 587-592.
7. *Ekwall B., Ekwall K.*: Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA* 1998, 15, 193-201.
8. *Engelhard G., Wallnöfer P.*: Effect of 2-methyl and 2-halogen substitution on the rate of hydrolysis of benzaniilide fungicides by *Bacillus sphaericus*. *Chemosph.* 1976, 2, 91-94.
9. *Fuchs A.*: Stereoselectivity of Pesticides: Biological and Chemical Problems. ed. Ariens E. J., van Rensen J. J. S., Welling W., Elsevier, Amsterdam 1988, 203-262.
10. *Grądzki Z., Boguta L., Winiarczyk S.*: Grzybnica skóry psów i możliwość zakażenia nią ludzi. *Medycyna Wet.*, 2001, 57, 815-818.
11. *Husøy T., Syversen T., Jensen J.*: Comparison of four in vitro cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, Uridine Incorporation and Protein Measurements. *Toxicol. In Vitro*, 1993, 7, 149-154.
12. *INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology „The FRAME cytotoxicity test (Kenacid Blue)”* 1992, Nr 3b.
13. *INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology „The Neutral Red cytotoxicity assay”* 1992, Nr 64.
14. *INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology „MTT assay”* 1990, Nr 17.
15. *Jóźwiak K., Szumilo H., Niewiadomy A.*: Correlation between RP-HPLC data and bactericidal or antimycotic activity of some thiobenzaniilides. Second European Symposium on Antimicrobial Agents: Mechanism of Action and Structure-Activity Relationships. *Folia Pharm. Univ. Carol. Praga* 1998, 23, 95.
16. *Kleinrok Z., Niewiadomy A., Matysiak J.*: Evaluation of toxic activity of 2, 4-dihydroxybenztioanilides. *Pharmazie* 2002, 57, 198-199.
17. *Klimešová V., Svoboda M., Waisser K., Kaustová J., Buchta V., Králová K.*: Synthesis of 2-benzylthiopyridine-4-carbothioamide derivatives and their antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity. *Eur. J. Med. Chem.* 1999, 34, 433-440.
18. *Klimešová V., Svoboda M., Waisser K., Pour M., Kaustová J.*: Synthesis and antimicrobial activity of new 4-(benzylsulfanyl)pyridine derivatives. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1999, 64, 417-442.
19. *Kowalska-Pylka H., Majer-Dziedzic B., Niewiadomy A., Matysiak J.*: Evaluation of the toxicity of substituted benzaniilides by using in vitro tests. *ATLA* 2001, 29, 547-556.
20. *Lavrijsen K., Van Dijck D., Van Houdt J., Van Pelt I., Meuldermans W., Heykants J.*: In vitro screening for hepatotoxicity of xenobiotics using isolated hepatocytes. *ATLA* 1988, 15, 201-207.
21. *Li A.*: Primary hepatocyte cultures as an in vitro experimental model for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interaction. *Adv. Pharmacol.* 1997, 43, 103-130.
22. *Matysiak J., Niewiadomy A., Mącik-Niewiadomy G.*: In vitro inhibition properties of a new group of thiobenzaniilides in relation to yeast. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000, 10, 119-123.
23. *Menard C., Lambiale D., Vistelle R., Morin E., Ratanasavann D.*: Stereoselective biotransformation of cicletanine in cultured rat and human hepatocytes. *Pharm. Res.* 2000, 42, 87-92.
24. *Mitchell S. C., Norbury H. M., Waring R. H., Gaolsden P. M., Wood P. B.*: A comparison of the metabolism and elimination of benzaniilide and salicylanilide in the rat. *Xenobiot.* 1982, 12, 93-99.
25. *Modzelewska-Banachiewicz B., Matysiak J.*: Synteza nowych pochodnych 1, 3, 4-tiadiazolu o spodziewanej aktywności biologicznej. XVIII Naukowy Zjazd Pol. Tow. Farmaceut. „Farmacja w XXI wieku”. Poznań 2001, 2, 641.
26. *Niewiadomy A., Matysiak J., Kostecka M., Mącik-Niewiadomy G.*: Aktywność biologiczna nowej grupy tiobenzaniilidów. *Pestycydy* 1998, 2-3, 11-15.
27. *Niewiadomy A., Matysiak J., Mącik-Niewiadomy G., Kornilowicz T.*: Dependence of fungistatic activity of 2, 4-dihydroxythiobenzaniilides on the structure and lipophilic nature of the compounds. *Eur. J. Med. Chem.* 2000, 35, 393-404.
28. *Niewiadomy A., Matysiak J., Mącik-Niewiadomy G.*: In vitro evaluation of 2, 4-dihydroxythiobenzaniilides against various moulds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001, 13, 243-248.
29. *Niewiadomy A., Żabińska A., Matysiak J., Różyło J. K.*: Reversed-phase high performance liquid chromatography in quantitative structure-activity relationship studies of new fungicides. *J. Chromatogr.* 1997, 791, 237-243.
30. *Ponsoda X., Jover R., Nunez C., Royo M., Castell J. V., Gomez-Lechoń M. J.*: Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: correlation between in vitro data and human lethal concentration. *Toxicol. Vitro* 1995, 9, 959-966.
31. *Pour M., Špulak M., Balšánek V., Kuneš J., Buchta V., Waisser K.*: 3-phenyl-5-methyl-2H, 5H-furan-2-ones: tuning antifungal activity by varying substituents on the phenyl ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 1893-1895.
32. *Riddell R. J., Clothier R. H., Balls M.*: An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, 469-471.
33. *Singh P. D. A., Waring R. H., Mitchell S. C.*: Enzymic hydrolysis of substituted benzaniilides. *Physiology* 1982, 10, 729.
34. *Stark D. M., Shopis C., Borenfreund E., Babich H.*: Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, 449-455.
35. *Szatanke K., Rządowska M.*: Synteza nowych pochodnych imidazo [2, 1-C][1,2,4] triazolu o spodziewanym działaniu przeciwgrzybiczym. XVIII Zjazd Pol. Tow. Farmaceut. „Farmacja w XXI wieku”. Poznań 2001, 2, 639.
36. *Waisser K., Houbgedji N., Macháček M., Sekera M., Urban J., Odlerová Ž.*: Antimycobacterial thiobenzaniilides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1990, 55, 307-316.
37. *Waisser K., Kubicová L., Dostál H.*: Biological effects of substances similar to salicylanilides: thiobenzaniilides. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 1998, 23, 59-66.
38. *Waisser K., Kuneš J., Odlerová Ž., Roman M., Horák V.*: Antimycobacterial activity of 3'- and 4'-fluorothiobenzaniilides. *Pharmazie* 1998, 53, 193-195.
39. *Zapór L., Karlik W., Skowroń J., Gołofit-Szymczak M., Wiechetek M.*: Zastosowanie izolowanych komórek wątroby do oceny toksycznego działania substancji chemicznych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2000, 33, 269-275.
40. *Zapór L., Skowroń J., Miranowicz-Dzierżawska K., Gołofit M.*: Metody in vitro jako alternatywny model w badaniach działania toksycznego substancji chemicznych. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1998, 31, 199-205.