

Abstract

Project Code: MRG5480084

Project Title: Role of Iron and Iron Chelator in Pathogenesis and Treatment of Cryptococcal Infection

Investigator: Methee Chayakulkeeree, MD, PhD

Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Medicine, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University

E-mail Address: methee.cha@mahidol.ac.th

Project Period: 2.5 years (15 June 2011 to 14 December 2013)

Introduction: The iron chelator, deferasirox (DFX), has shown to have fungicidal activity against *Rhizopus*. This work is to investigate the potential antifungal activity of iron chelators, deferoxamine (DFO) and DFX, against cryptococcal isolates and their impacts on expression of cryptococcal iron-related genes.

Methods: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* were used to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of DFO and DFX and the fractional inhibitory concentration (FIC) of the combinations between the iron chelators and amphotericin B (AMB). Growth curves of cryptococcal strains in exposure to iron chelators, with and without AMB, were performed. Expression of cryptococcal *CFT1*, *CFT2*, and *CIR1* genes was determined using semi-quantitative real-time PCR.

Results: Both DFO and DFX alone show no antifungal activity against *Cryptococcus* strains. However, when combined with AMB, the MIC of both DFO and DFX decreased from >200 µg/ml to 6.25 µg/ml for serotypes A and AD. For serotypes B, C and D, the MIC of DFO and DFX decreased from > 200 µg/ml to 6.25 and 12.5 µg/ml, respectively. Likewise, the MIC of AMB decreased for one dilution in all strains when combined with iron chelators, giving the FIC of 0.5 and 1 for DFO+AMB and DFX+AMB, respectively. Growth curve of *C. neoformans* (serotype A and D) showed a significant growth retardation of the yeast cells when incubated with a combination of sub-MIC concentration of AMB and DFO, compared with either AMB or DFO alone. However, *C. gattii* (serotype B and C) exhibited significantly less extent in growth retardation in media with DFO+AMB. In contrast, cryptococcal growth retardation was not observed, or minimal, when DFX is used in combination with AMB in all serotypes. When *C. neoformans* was grown in DFO, the *CFT1*, *CFT2* and *CIR1* were expressed for 1.7, 2.0 and 0.9 times of control, respectively. With DFX, the *CFT1*, *CFT2* and *CIR1* were expressed for 0.5, 0.6 and 0.3 times of control, respectively.

Conclusions: The extent of synergistic effect between DFO+AMB was more than that of DFX+AMB and this is different to Zygomycetes in which DFO enhances fungal growth. *CFT1* and *CFT2* overexpression seems to be the major mechanism related to growth inhibitory effect of DFO.

Keywords: Cryptococcus, cryptococcosis, iron chelator, pathogenesis, antifungal

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480084

ชื่อโครงการ: การศึกษาบทบาทธาตุเหล็กและยาขับเหล็กในพยาธิกำเนิดและการรักษาโรคติดเชื้อคริปโต

คอคคัส

ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร.นพ. เมธี ชยะกุลศิริ

สาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address: methee.cha@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 2.5 ปี (15 มิถุนายน 2554 ถึง 14 ธันวาคม 2556)

บทนำ: การศึกษาในอดีตพบว่ายาขับเหล็กดีเฟอราซิรอกซ์ (deferasirox หรือ DFX) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราไรโซปัส (*Rhizopus*) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราของยาขับเหล็ก คือ ดีเฟอโรกซามีน (deferoxamine หรือ DFO) และ DFX ต่อเชื้อราคริปโตคอคคัส (*Cryptococcus*) และผลของยาเหล่านี้ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับธาตุเหล็กของเชื้อคริปโตคอคคัส

วิธีการศึกษา: หาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของยา DFO และ DFX ต่อเชื้อ *Cryptococcus neoformans* และ *Cryptococcus gattii* และคำนวณค่า fractional inhibitory concentration (FIC) ของยาผสมระหว่าง DFO หรือ DFX กับ amphotericin B (AMB) และสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโตของสายพันธุ์คริปโตคอคคัส ในภาวะที่มียาขับเหล็กอย่างเดียวและภาวะที่มียาขับเหล็กร่วมกับ AMB และศึกษาการแสดงออกของยีน *CFT1* *CFT2* และ *CIR1* โดยใช้วิธี semi-quantitative real-time PCR ในภาวะต่าง ๆ ดังกล่าว

ผลการศึกษา: ยาขับเหล็ก DFO และ DFX ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Cryptococcus* โดยตรงแต่เมื่อใช้ร่วมกับยา AMB พบว่า MIC ของยา DFO และ DFX นั้นลดลงจาก $> 200 \mu\text{g/ml}$ เป็น $6.25 \mu\text{g/ml}$ ในเชื้อคริปโตคอคคัส ซีโรทัยป์ A และ AD สำหรับซีโรทัยป์ B C และ D พบว่าค่า MIC ของ DFO และ DFX ลดลงจาก $> 200 \mu\text{g/ml}$ เป็น 6.25 และ $12.5 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และค่า MIC ของ AMB ลดลง 1 ความเข้มข้นในทุกสายพันธุ์เมื่อให้ร่วมกับยาขับเหล็ก ดังนั้นสำหรับ DFO+AMB และ DFX+AMB จึงคำนวณค่า FIC ได้ 0.5 และ 1 ตามลำดับ จากกราฟแสดงการเจริญเติบโต พบว่า *C. neoformans* (ซีโรทัยป์ A และ D) มีการเจริญเติบโตช้าลงมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี AMB ร่วมกับ DFO เปรียบเทียบกับเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน AMB หรือ DFO อย่างเดียว แต่สำหรับ *C. gattii* (ซีโรทัยป์ B และ C) มีการเจริญเติบโตช้าลงไม่มากเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี DFO ร่วมกับ AMB ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อใน DFX ร่วมกับ AMB นั้น ไม่พบว่าการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแต่อย่างใด เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. neoformans* ใน DFO เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าการแสดงออกของยีน *CFT1* *CFT2* และ *CIR1* เป็น 1.7, 2.0 และ 0.9 เท่าตามลำดับ และเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน DFO พบว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าว เป็น 0.5, 0.6 และ 0.3 เท่าตามลำดับ

บทสรุป: การศึกษานี้พบมีการเสริมฤทธิ์กันของยา DFO และ AMB ในการยับยั้งเชื้อคริปโตคอคคัส มากกว่าฤทธิ์ของยา DFX ร่วมกับ AMB ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในเชื้อรา Zygomycetes ที่พบว่า DFO ทำให้เชื้อเจริญเติบโตมากขึ้น การแสดงออกมากขึ้นของ *CFT1* และ *CFT2* อาจเป็นกลไกหลักที่สัมพันธ์กับฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของ DFO

คำสำคัญ: คริปโตคอคคัส, คริปโตคอคโคสิส, ยาขับเหล็ก, พยาธิกำเนิด, ยาด้านเชื้อรา