

สัญญาเลขที่ MRG5480084

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาบทบาทธาตุเหล็กและยาขับเหล็กใน
พยาธิกำเนิดและการรักษาโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัส
**Role of Iron and Iron Chelator in Pathogenesis and
Treatment of Cryptococcal Infection**

ผู้วิจัย รศ.ดร.นพ.เมธี ชยะกุลคีรี
สังกัด สาขาวิชาโรคติดเชื้อและอายุรศาสตร์เขตร้อน
ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

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: การศึกษาบทบาทธาตุเหล็กและยาขับเหล็กในพยาธิกำเนิดและการรักษาโรคติดเชื้อคริปโตคอกคัส

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 ต่อเชื้อราคริปโตคอกคัส (*Cryptococcus*) และผลของยาเหล่านี้ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับธาตุเหล็กของเชื้อคริปโตคอกคัส

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) และสร้างกราฟแสดงการเจริญเติบโตของสายพันธุ์คริปโตคอกคัส 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 $6.25 \mu\text{g/ml}$ ในเชื้อคริปโตคอกคัส 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 ในการยับยั้งเชื้อคริปโตคอกคัส มากกว่าฤทธิ์ของยา DFX ร่วมกับ AMB ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในเชื้อรา Zygomycetes ที่พบว่า DFO ทำให้เชื้อเจริญเติบโตมากขึ้น การแสดงออกมากขึ้นของ *CFT1* และ *CFT2* อาจเป็นกลไกหลักที่สัมพันธ์กับฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของ DFO

คำสำคัญ: คริปโตคอกคัส, คริปโตคอกโคสิส, ยาขับเหล็ก, พยาธิกำเนิด, ยาด้านเชื้อรา

Executive Summary

รายละเอียดโครงการ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคติดเชื้อราคริปโตคอคคัส (*Cryptococcus* spp.) หรือ cryptococcosis เป็นโรคติดเชื้อฉวยโอกาสที่เป็นปัญหาสำคัญและพบเป็นอันดับสามของการติดเชื้อฉวยโอกาส ในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือโรคเอดส์ (AIDS) รองจากวัณโรค และโรคปอดอักเสบจากเชื้อ *Pneumocystis jiroveci* ซึ่งมักจะพบในผู้ป่วยที่มีเม็ดเลือดขาว CD_4^+ lymphocyte ต่ำกว่า 100 เซลต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีการใช้ยาต้านไวรัสอย่างแพร่หลายมากขึ้นใน อัตราการติดเชื้อฉวยโอกาสในกลุ่มผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องที่ได้รับยาต้านไวรัสลดลงถึงครึ่งหนึ่ง แต่ก็ยังมีผู้ป่วยดังกล่าวที่ติดเชื้อคริปโตคอคคัสเป็นจำนวนมาก โดยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 – พฤษภาคม พ.ศ. 2553 ในประเทศไทยพบผู้ป่วยโรค cryptococcosis มากถึง 51,676 ราย คิดเป็นร้อยละ 13.71 ของผู้ป่วย HIV ทั้งหมด นอกจากนี้เชื้อราคริปโตคอคคัสยังสามารถก่อโรคได้ในคนปกติที่ไม่ได้มีภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติอีกด้วย

เชื้อราคริปโตคอคคัสสามารถก่อโรคในอวัยวะต่าง ๆ ได้หลายอวัยวะ ที่พบบ่อย ได้แก่ ระบบประสาทส่วนกลาง ปอด ผิวหนัง และการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย มีการกำหนดแนวทางการรักษาของ Infectious Diseases Society of America (IDSA) แบ่งเป็น induction phase, consolidation phase และ maintenance phase โดยมีหลักตามแนวทางการรักษาปี 2553 (Clinical Practice Guidelines 2010) คือ ช่วง induction ใช้ยา 2 ชนิดร่วมกัน คือ amphotericin B และ flucytosine เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ส่วนในช่วง consolidation ใช้ยา fluconazole ในการรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ และในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง ต้องให้ยาช่วง maintenance ต่อด้วย fluconazole ลดขนาด จนระดับ CD_4^+ lymphocyte เพิ่มขึ้นมากกว่า 100 เซลต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ผู้ป่วยที่ติดเชื้อคริปโตคอคคัสจะได้รับการรักษาด้วยยาด้านเชื้อราตามแนวทางการรักษาที่เหมาะสมแล้ว อัตราการตายยังคงสูงถึงร้อยละ 25-30 และการเกิดความพิการสูงประมาณร้อยละ 40 โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนาอัตราตายจะสูงขึ้น นอกจากนี้ ในประเทศไทยไม่มียา flucytosine สำหรับใช้ในการรักษาในช่วง induction ส่วนใหญ่จึงเป็นการใช้ยาเพียงตัวเดียวคือ amphotericin B เป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็น fluconazole จึงอาจทำให้ผลของการรักษาไม่ดีเท่าที่ควร ดังนั้น การศึกษาเพื่อหาปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคและแนวทางใหม่ในการรักษาโรคติดเชื้อคริปโตคอคคัส จึงมีความสำคัญและจำเป็น เนื่องจากการรักษาที่มีในปัจจุบันยังไม่ดีพอ การศึกษาพยากรณ์การเกิดโรค และยาด้านเชื้อราใหม่จึงเป็นหนทางนำไปสู่การรักษาและป้องกันโรคติดเชื้อ คริปโตคอคคัสที่ดีขึ้น ชาติหลักเป็นชาติที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ดังนั้นการศึกษานี้จึงต้องการจะศึกษาบทบาทของธาตุหลักและยาขับเหล็กต่อการติดเชื้อคริปโตคอคคัส

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- วัตถุประสงค์หลัก (primary objectives)

- 1.) เพื่อศึกษาความสามารถของยาขับเหล็ก deferoxamine และ deferasirox ในการยับยั้งเชื้อ คริปโตคอคคัสสายพันธุ์ต่าง ๆ
- 2.) ศึกษาผลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำเหล็กเข้าเซลล์ (CFT1 และ CFT2) และยีนที่ควบคุมธาตุเหล็ก (CIR1) ของเชื้อคริปโตคอคคัส

3.) ศึกษาผลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของ virulence factors ที่สำคัญ

- **วัตถุประสงค์รอง (secondary objective)**

4.) เพื่อศึกษาความแตกต่างระดับของธาตุเหล็กในผู้ป่วยโรคมะเร็งที่มีภาวะขาดธาตุเหล็กที่มีการติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ

3. ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษานี้มี 2 ส่วน คือ การศึกษาในห้องทดลอง (วัตถุประสงค์หลัก 1-3) และการศึกษาในผู้ป่วย (วัตถุประสงค์รอง 4)

1. การศึกษาในห้องทดลอง (วัตถุประสงค์หลัก 1-3)

เชื้อที่จะใช้ในการศึกษาคือ *C. neoformans* (serotype A และ D) และ *Cryptococcus gattii* (serotype B และ C) ทั้ง 4 สายพันธุ์ 8 molecular types (รวม 9 strains ได้แก่ H99, WM148, WM626, WM628, WM629, WM179, WM178, WM175 และ WM779) และเชื้อ *Cryptococcus* spp. clinical isolates 15 isolates (รวมทั้งสิ้น 24 isolates)

วัตถุประสงค์หลัก 1: เพื่อศึกษาความสามารถของยาขับเหล็ก deferoxamine และ deferasirox ในการยับยั้งเชื้อ คริปโตคอคคัสสายพันธุ์ต่าง ๆ

Rationale: จากการศึกษาในเชื้อราชนิดอื่น ยาขับเหล็ก deferasirox มีฤทธิ์ fungicidal ต่อเชื้อราบางชนิด จากคุณสมบัติในการกำจัดเหล็กออกจากเซลล์เชื้อรา ทำให้เชื้อไม่สามารถนำธาตุเหล็กไปใช้ได้ การศึกษาเบื้องต้นพบว่ายาขับเหล็กอาจมีคุณสมบัติเป็น partial synergism กับยา amphotericin B ต่อเชื้อ *Cryptococcus* โดยให้ค่า FICI ประมาณ 0.5

Experimental design

- หาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของยา deferoxamine และ deferasirox ต่อเชื้อ *Cryptococcus* spp. ทั้ง 24 isolates โดยวิธี broth dilution test

- ศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาขับเหล็กทั้งสองชนิดกับ ยา amphotericin B และ fluconazole โดยวิธี checkerboard method และคำนวณค่า FICI ของเชื้อ

- ศึกษา growth curve ของเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* ทั้ง 4 serotypes ในภาวะที่มี deferasirox หรือ deferoxamine ร่วมกับ amphotericin B เปรียบเทียบกับ amphotericin B alone เพื่อดูผลของ deferasirox ในการยับยั้งเชื้อ

- ศึกษา growth curve ของเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* ทั้ง 4 serotypes ในภาวะที่มี iron excess เปรียบเทียบกับ ภาวะปกติและภาวะที่มียาขับเหล็ก เพื่อดูผลของ iron ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

- หากพบมีการยับยั้งเชื้อคริปโตคอคคัสโดยยาขับเหล็กในสภาวะใดสภาวะหนึ่ง จะศึกษาผลของการเติมธาตุเหล็ก ลงไปในสภาวะเหล่านั้นเพื่อดูว่าสามารถทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ปกติหรือไม่

ผลการศึกษา

พบว่าการเสริมฤทธิ์กันระหว่าง amphotericin B กับ DFO และจากการศึกษา growth curve พบว่า *C. neoformans* แสดงผลชัดเจนกว่า *C. gattii* และเมื่อเติมธาตุเหล็กเข้าไปในเชื้อที่เลี้ยงด้วย amphotericin B ร่วมกับ DFO แล้วนั้น พบว่าสามารถที่จะทำให้เชื้อกลับมาเจริญเติบโตได้ กล่าวคือ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อของ DFO จะหมดไป ส่วนการทดสอบยาร่วมกันระหว่าง amphotericin B ร่วมกับ DFX และ fluconazole ร่วมกับ DFO หรือ DFX นั้น ไม่มีผลเสริมฤทธิ์กัน

วัตถุประสงค์หลัก 2: ศึกษาผลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำเหล็กเข้าเซลล์ (*CFT1* และ *CFT2*) และยีนที่ควบคุมธาตุเหล็ก (*CIR1*) ของเชื้อคริปโตคอกคัส

Rationale: *CFT1* และ *CFT2* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ iron transport ในเชื้อ *Cryptococcus* spp. และ *CIR1* เกี่ยวข้องกับการควบคุม iron ในเซลล์ของ *Cryptococcus* และยังคงควบคุมการแสดงออกของ virulence factors หลายชนิด ดังนั้นการลดลงของธาตุเหล็กจากผลของยาขับเหล็กจึงน่าจะมีผลให้มีการแสดงออกของยีนดังกล่าวเพิ่มขึ้น (up-regulation)

Experimental design

- เชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* จะถูกเพาะเลี้ยงใน broth ที่มี deferasirox หรือ deferoxamine 200 µg/ml และเก็บเซลล์ที่เวลา 0 และ 12-18 ชั่วโมงหลังจากเพาะเชื้อเพื่อแยก RNA
- วัดปริมาณ RNA และสร้าง cDNA จาก RNA
- หาปริมาณของ *CFT1*, *CFT2* และ *CIR1* expression โดย quantitative real-time PCR

ผลการศึกษา

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. neoformans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี DFO พบว่ามีการ up-regulation ของ *CFT1* และ *CFT2* genes ส่วน *CIR1* gene นั้นมี down-regulation เล็กน้อย แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. neoformans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี DFX พบว่ามีการ down-regulation ของทั้ง *CFT1*, *CFT2* และ *CIR1* gene ชัดเจน

วัตถุประสงค์หลัก 3: ศึกษาผลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของ virulence factors ที่สำคัญทั้งในระดับ phenotypes และ gene expression

Rationale: จากการศึกษาของ Jung *et al.* (12, 13) โดยวิธี targeted gene deletion ของยีน *CFT1* และ *CIR1* พบว่า gene ทั้งสองมีความสำคัญต่อ cryptococcal virulence และอาจควบคุม cryptococcal virulence factors เช่น ความสามารถในการเจริญเติบโตที่ 37°C และการสร้างแคปซูล ดังนั้น ภาวะขาดเหล็กจากยาขับเหล็ก อาจมีผลต่อ expression ของ virulence factors ดังกล่าว

Experimental design

- เชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* จะถูกเพาะเลี้ยงใน broth ที่มี deferasirox หรือ deferoxamine 200 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ควบคู่กับเชื้อที่เลี้ยงใน broth ปกติและศึกษาเปรียบเทียบ virulence factors คือ

1. ศึกษาขนาดของ capsular polysaccharide ในภาวะที่มีและไม่มียาขับเหล็ก โดยเพาะเชื้อใน YNB broth และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ขนาดของ capsule ประเมินโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์และหาค่า capsule: whole cell ratio

2. ความสามารถในการเจริญเติบโตที่ 37°C โดยการเพาะเชื้อใน YPD medium ที่อุณหภูมิ 37°C

ผลการศึกษา

ยาขับเหล็กทั้ง 2 ชนิด ไม่มีผลต่อการสร้างแคปซูลของเชื้อ และไม่มีผลต่อการเจริญที่อุณหภูมิ 37°C ของเชื้อ *C. neoformans*

2. การศึกษาในผู้ป่วย (วัตถุประสงค์รอง 4)

วัตถุประสงค์รอง 4: ศึกษาความแตกต่างระดับของธาตุเหล็กในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อคริปโตคอกคัส)

Rationale: จากการศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดในอดีตโดย Iglesias-Osma C. *et al.* (ตีพิมพ์ใน J Clin Pathol 1995;48:223-5) พบว่าผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อราชนิดลูกกลมจะมีการเพิ่มขึ้นของ transferrin saturation, serum ferritin และ serum iron ส่วนค่า serum transferrin และ total iron binding capacity (TIBC) ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อราลูกกลมนั้นจะต่ำกว่าผู้ป่วยที่ไม่ได้ติดเชื้อรา ซึ่งบ่งถึงว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างภาวะเหล็กเกินกับการติดเชื้อรา โดยการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ของภาวะเหล็กเกินกับโรคมะเร็งเม็ดเลือดของผู้ป่วย ดังนั้นภาวะเหล็กเกินอาจมีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อราคริปโตคอกคัสได้และหากเป็นเช่นนั้นการลดระดับธาตุเหล็กในร่างกายอาจช่วยป้องกันหรือมีผลต่อการรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อคริปโตคอกคัสได้

รูปแบบงานวิจัย cross-sectional study

ประชากรที่ศึกษา

- แหล่งที่มาของประชากร

ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่ได้รับการวินิจฉัยเป็น cryptococcosis (โดยตรวจพบเชื้อจากการเพาะเชื้อ india ink หรือ cryptococcal antigen ให้ผลบวก) โดยได้รับการวินิจฉัยภายใน 1 ปีและกำลังได้รับการรักษาอยู่จำนวน 15 รายและผู้ติดเชื้อที่ไม่ได้เป็น cryptococcosis ที่ CD_4^+ ต่ำกว่า 100 เซลล์ต่อ ลบ.มม. และผลการเพาะเชื้อตรวจ cryptococcal antigen ได้ผลลบ จำนวน 16 ราย (control)

- การได้มาซึ่งประชากรที่ศึกษา

ผู้ป่วยที่มีเกณฑ์ ครบตามที่กำหนด จะได้รับการสอบถามความสมัครใจในการเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยจะสอบถามผู้ป่วยโดยตรงหรือญาติสายตรง จากผู้ร่วมโครงการวิจัย หากผู้ป่วยสนใจ ผู้ร่วมโครงการวิจัยก็จะแจ้งรายละเอียดของโครงการวิจัยตามเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมการวิจัย และขอความยินยอมจากผู้ป่วยหรือญาติผู้ป่วย

- สิ่งที่ผู้วิจัยจะให้กับประชากรที่ศึกษา (Intervention)

- 1.) ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจ iron study ได้แก่ serum iron, ferritin, total iron binding capacity (TIBC), serum transferrin, transferrin saturation

ผลการศึกษา

ผู้ป่วย HIV ที่เป็นและไม่เป็นโรค cryptococcosis ไม่มีความแตกต่างกันในระดับของ serum iron, ferritin, total iron binding capacity (TIBC), serum transferrin, transferrin saturation

เนื้อหาทางทฤษฎี

วัตถุประสงค์ 1

(1) วัตถุประสงค์ของโครงการ: เพื่อศึกษาความสามารถของยาขับเหล็ก deferoxamine และ deferasirox ในการยับยั้งเชื้อ คริปโตคอคคัสสายพันธุ์ต่าง ๆ

(2) ระเบียบวิธีวิจัย

- 2.1 หาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของยา deferoxamine และ deferasirox ต่อเชื้อ *Cryptococcus* spp. รวม 24 isolates โดยวิธี broth dilution test
- 2.2 ศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาขับเหล็กทั้งสองชนิดกับ ยา amphotericin B โดยวิธี checkerboard method และคำนวณค่า FICI ของเชื้อรวม 24 strains
- 2.3 ศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างยาขับเหล็กทั้งสองชนิดกับ ยา fluconazole โดยวิธี checkerboard method และคำนวณค่า FICI ของเชื้อรวม 3 strains
- 2.4 ศึกษา growth curve ของเชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* ทั้ง 4 serotypes ในภาวะที่มี deferasirox หรือ deferoxamine ร่วมกับ amphotericin B เปรียบเทียบกับ amphotericin B alone เพื่อดูผลของ deferasirox ในการยับยั้งเชื้อ
- 2.5 ศึกษา growth curve ของเชื้อ *C. neoformans* ในภาวะที่มี iron excess เปรียบเทียบกับ ภาวะปกติและภาวะที่มียาขับเหล็ก เพื่อดูผลของ iron ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ

(3) ผลการศึกษา

3.1 ค่า MIC ของ DFX และ DFO และ FICI ของ เมื่อให้ร่วมกับ Amphotericin B ต่อเชื้อ *C. neoformans* พบมี synergy ระหว่าง DFO และ Amphotericin B

Agents / Organisms	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	WM 626	H 99	WM 148	WM 629	WM 628
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200	>200	>200
Amphotericin B	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5
Amphotericin B + DFO	0.25 / 6.25	0.25 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.03125	1.03125	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.53125	0.53125	0.53125	0.53125	0.53125

3.2 ค่า MIC ของ DFX และ DFO และ FICI ของ เมื่อให้ร่วมกับ Amphotericin B ต่อเชื้อ *C. gattii* พบมี synergy ระหว่าง DFO และ Amphotericin B

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)			
	WM 179	WM 175	WM 178	WM 779
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0	0.5
Amphotericin B + DFX	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.25 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625	1.03125
FICI of Amphotericin B + DFO	0.53125	0.53125	0.53125	0.53125

3.3 ค่า MIC ของ DFX และ DFO และ FICI ของ เมื่อให้ร่วมกับ Amphotericin B ต่อเชื้อ *คริปโตคอคคัส* ที่แยกได้จากผู้ป่วย 15 สายพันธุ์ พบ FICI ของ DFO และ Amphotericin B อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 0.75

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT009	ICT015	ICT016
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.53125	0.53125	0.53125

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT001	ICT003	ICT006
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	0.5	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.25 / 6.25	0.25 / 6.25	0.5 / 50
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.53125	0.53125	0.75

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT007	ICT008	ICT012
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 25	0.5 / 50	0.5 / 12.5
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.625	0.75	0.5625

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT013	ICT017	ICT020
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.53125	0.53125	0.53125

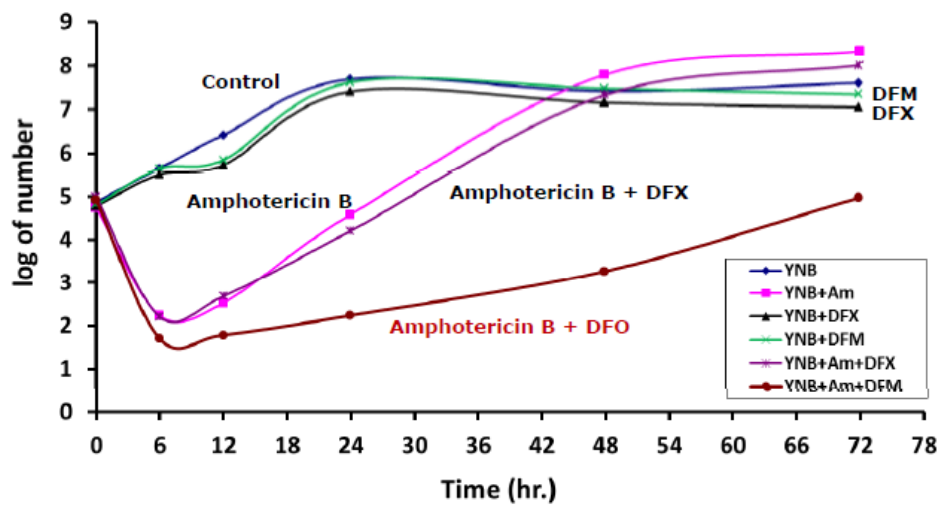
Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT021	ICT023	ICT029
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.53125	0.53125	0.53125

3.4 ค่า MIC ของ DFX และ DFO และ FICI ของ เมื่อให้ร่วมกับ Fluconazole ต่อเชื้อคริปโตคอคคัส สายพันธุ์ที่สำคัญ รวม 3 สายพันธุ์ ไม่พบมี synergy ระหว่าง DFO และ Fluconazole

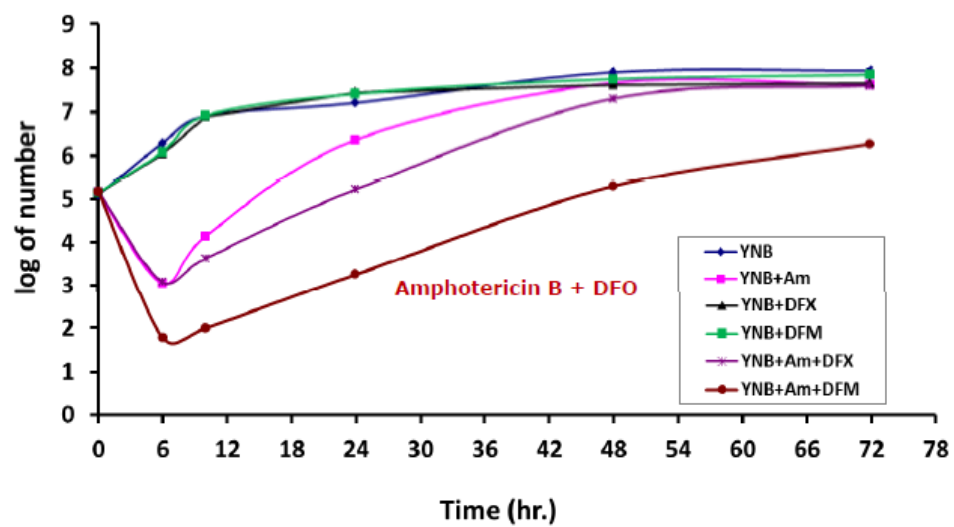
Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	H 99	WM 178	WM 626
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Fuconazole	2.0	8.0	1.0
Fuconazole + DFX	2.0 / 6.25	8.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Fuconazole + DFO	2.0 / 6.25	8.0 / 6.25	1.0 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	1.0625	1.0625	1.0625

3.5 Growth curve ของ *C. neoformans* (serotype A และ D) ของ DFX และ DFO และเมื่อให้ร่วมกับ Amphotericin B พบมี synergy ระหว่าง DFO และ Amphotericin B

Serotype A

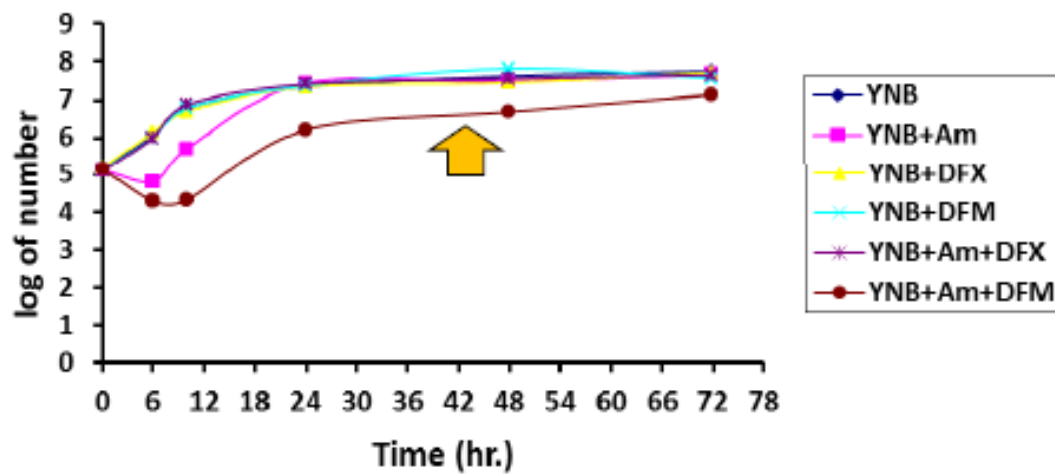


Serotype D

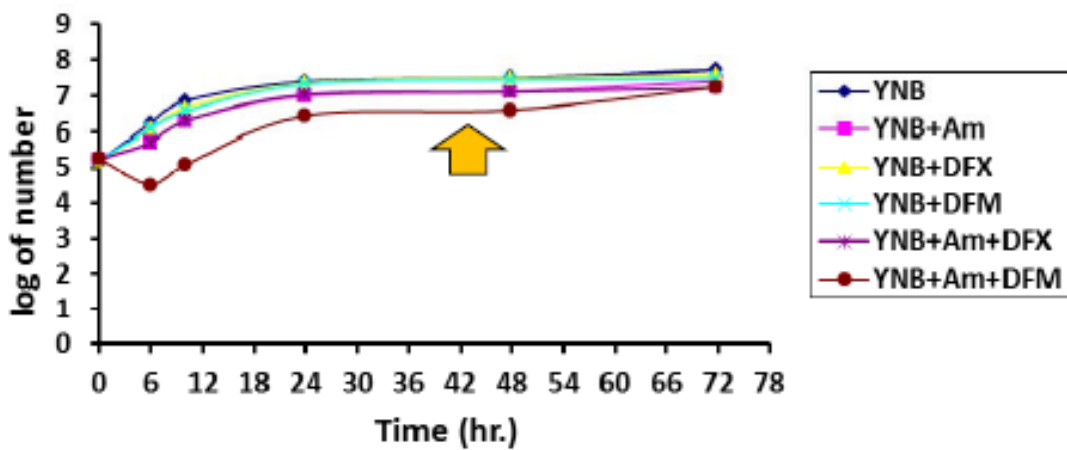


3.6 Growth curve ของ *C. gattii* (serotype B และ C) ของ DFX และ DFO และเมื่อให้ร่วมกับ Amphotericin B

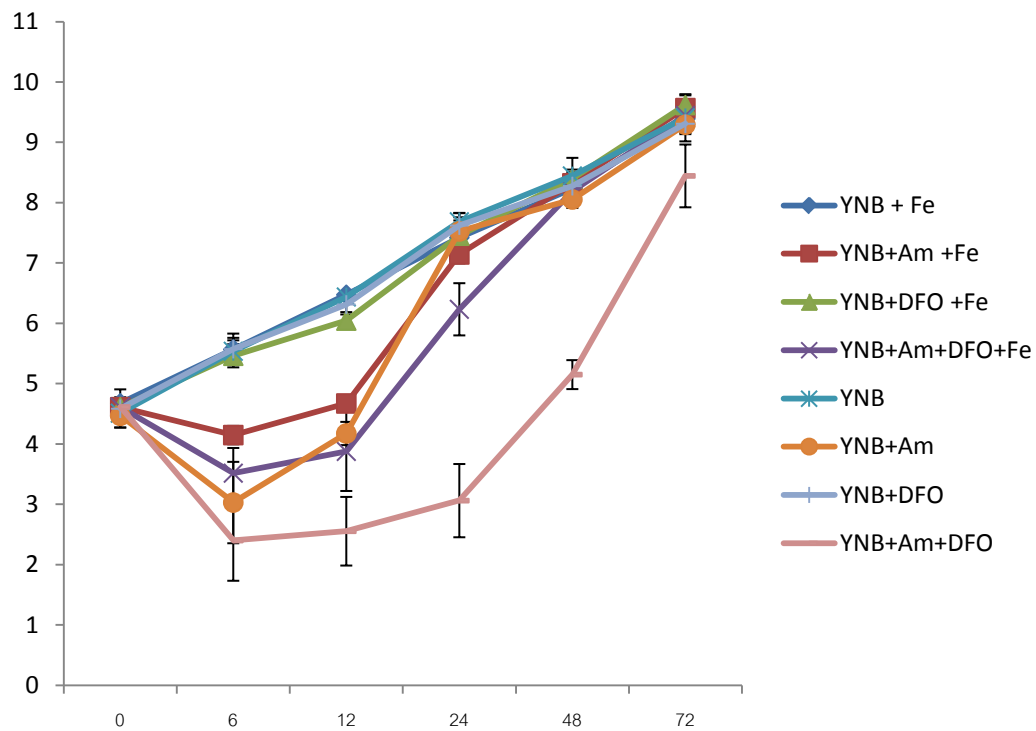
Serotype B



Serotype C



3.7 Growth curve ของ *C. neoformans* (serotype A) ของ DFX และ DFO และเมื่อให้ร่วมกับ Amphotericin B พบมี synergy ระหว่าง DFO และ Amphotericin B และผลดังกล่าวหายไปเมื่อเติม ธาตุเหล็กลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ



วัตถุประสงค์ 2

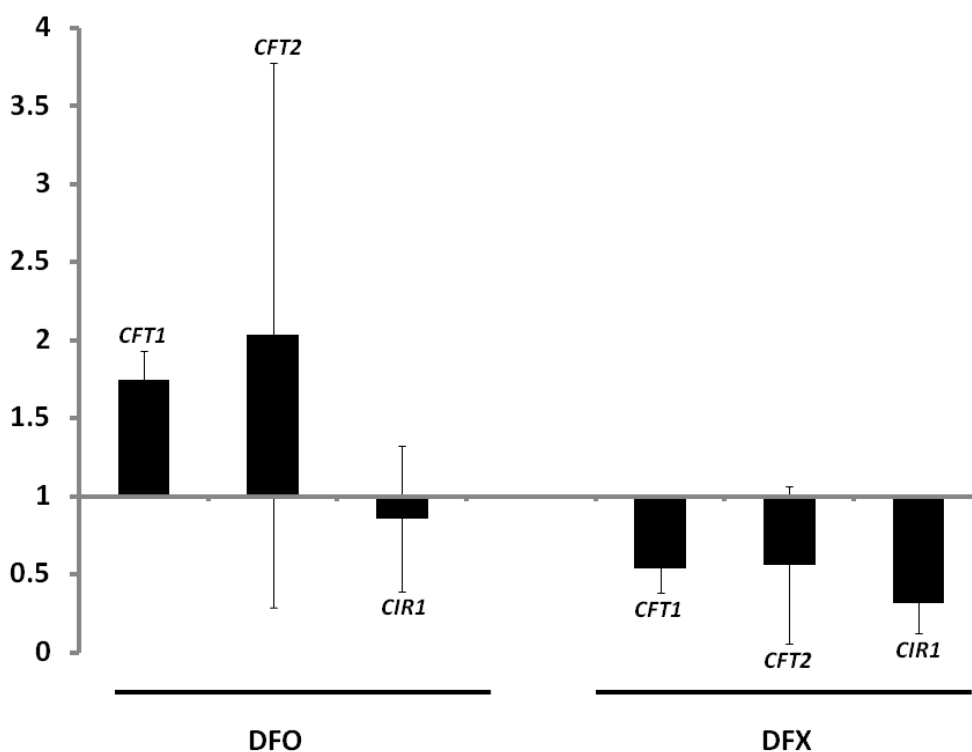
(1) วัตถุประสงค์ของโครงการ: ศึกษาผลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการนำเหล็กเข้าเซลล์ (*CFT1* และ *CFT2*) และยีนที่ควบคุมธาตุเหล็ก (*CIR1*) ของเชื้อคริปโตคอคคัส

(2) ระเบียบวิธีวิจัย

- 2.1 เชื้อ *C. neoformans* จะถูกเพาะเลี้ยงใน broth ที่มี deferasirox หรือ deferoxamine 200 µg/ml และเก็บเซลล์ที่เวลา 0 และ 12-18 ชั่วโมงหลังจากเพาะเชื้อเพื่อแยก RNA
- 2.2 วัดปริมาณ RNA และสร้าง cDNA จาก RNA
- 2.3 หาปริมาณของ *CFT1*, *CFT2* และ *CIR1* expression โดย quantitative real-time PCR
- 2.4 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (biological triplicates)

(3) ผลการศึกษา

Gene expression ของ *C. neoformans* (serotype A) เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มี DFO พบว่า มีการเพิ่มขึ้นในการแสดงออก (up-regulation) ของยีน *CFT1* (1.7 เท่า) และ *CFT2* (2.0 เท่า) แต่มีการลดลงของการแสดงออก (down-regulation) ของยีน *CIR1* เล็กน้อย (0.9 เท่า) แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มี DFX พบว่า การลดลงของการแสดงออก (down-regulation) ของยีน *CFT1*, *CFT2* และ *CIR1* ทั้งหมด 0.5, 0.6 และ 0.3 เท่าตามลำดับ ดังแสดงในกราฟข้างล่าง



วัตถุประสงค์ 3

(1) วัตถุประสงค์ของโครงการ: ศึกษาผลของยาขับเหล็กต่อการแสดงออกของ virulence factors ที่สำคัญทั้งในระดับ phenotypes และ gene expression

(2) ระเบียบวิธีวิจัย

เชื้อ *C. neoformans* และ *C. gattii* จะถูกเพาะเลี้ยงใน broth ที่มี deferasirox หรือ deferoxamine 200 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ควบคู่กับเชื้อที่เลี้ยงใน broth ปกติและศึกษาเปรียบเทียบ virulence factors คือ

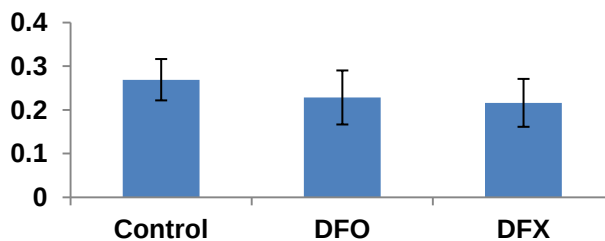
1. ศึกษาขนาดของ capsular polysaccharide ในภาวะที่มีและไม่มียาขับเหล็ก โดยเพาะเชื้อใน YNB broth ในภาวะที่มีและไม่มียาขับเหล็กทั้ง 2 ชนิด และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ขนาดของ capsule ประเมินโดยดูจากกล้องจุลทรรศน์และหาค่า capsule: whole cell ratio ทำการศึกษาในเชื้อจากผู้ป่วย 10 isolates และหาค่าเฉลี่ย

2. ความสามารถในการเจริญเติบโตที่ 37°C โดยการเพาะเชื้อใน YPD medium ที่อุณหภูมิ 37°C

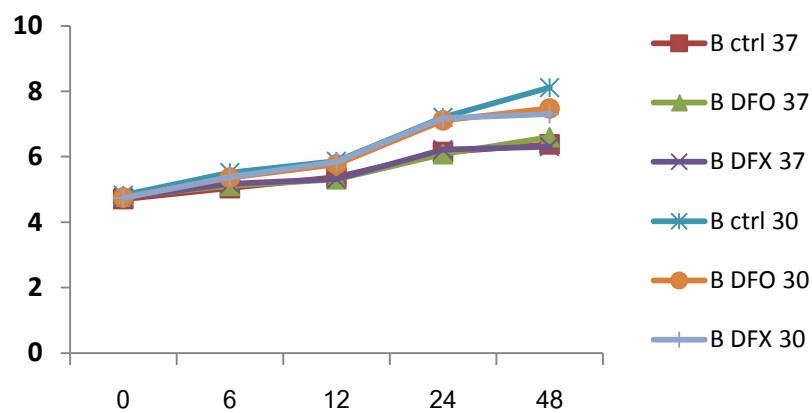
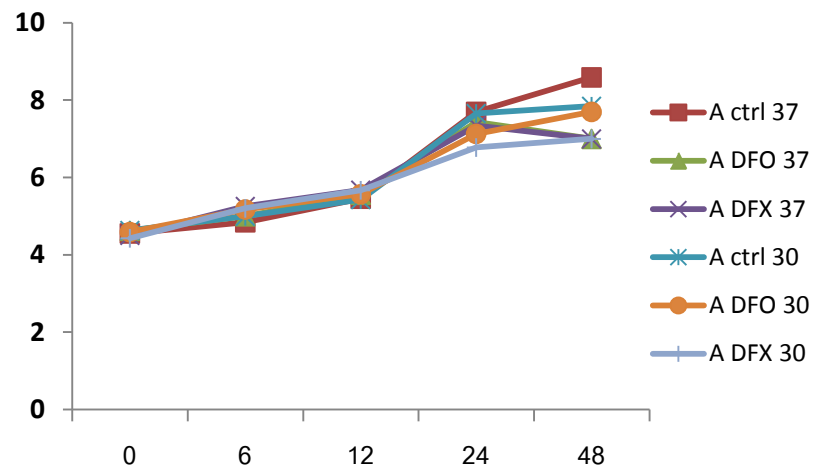
(3) ผลการศึกษา

1. ขนาดของ capsular polysaccharide คำนวณหา mean capsule: whole cell ratio ของเชื้อในภาวะที่มีและไม่มียาขับเหล็กไม่มีความแตกต่างกัน แสดงว่ายาขับเหล็กไม่มีผลต่อการสร้าง capsule ของเชื้อ ซึ่งเป็น virulence factor อย่างหนึ่ง ภาพข้างล่างแสดงถึงค่า capsule: whole cell ratio เฉลี่ย และ standard error

Capsule: whole cell ratio



2. Growth curve ของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C and 37°C พบว่ายา DFO และ DFX ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *C. neoformans* และ *C. gattii* ในอุณหภูมิต่างกัน (ctrl, control; A, serotype A; B, serotype B)



วัตถุประสงค์ 4

(1) วัตถุประสงค์ของโครงการ: ศึกษาความแตกต่างระดับของธาตุเหล็กในผู้ป่วยโรคภูมิคุ้มกันบกพร่องที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อคริปโตคอกคัส

(2) ระเบียบวิธีวิจัย ผู้ป่วยติดเชื้อ HIV ที่เป็น cryptococcosis จำนวน 15 ราย และที่ไม่ได้เป็น cryptococcosis จำนวน 16 ราย รวม 31 ราย ผู้ป่วยทั้งหมดมีระดับ CD_4^+ ต่ำกว่า 100 cells/mm^3 จะได้รับการเจาะเลือดเพื่อตรวจ iron study ได้แก่ serum iron, ferritin, total iron binding capacity (TIBC), serum transferrin และ transferrin saturation และเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มที่เป็นและไม่เป็น cryptococcosis

(3) ผลการศึกษา

ไม่พบมีความแตกต่างกันของระดับ serum iron, ferritin, total iron binding capacity (TIBC), serum transferrin และ transferrin saturation ของผู้ป่วย HIV ที่มีและไม่มี cryptococcal infection ($p > 0.05$)

	Group	N	Mean	Std. Deviation
Iron	Control	15	9.46	6.17
	Case	16	10.24	5.98
TIBC	Control	15	35.55	13.14
	Case	16	33.64	7.31
Transferrin saturation	Control	15	28.45	21.90
	Case	16	31.26	19.60
Ferritin	Control	15	3.24	4524.17
	Case	16	2.64	5338.19
Transferrin	Control	15	1.48	58.12
	Case	16	1.45	34.10

Output

1. บรรยายเรื่อง "Cryptococcosis in Siriraj Hospital: Past, Present and Future" ในงานประชุม Joint Symposium: University of Sydney and Siriraj Hospital วันที่ 2-3 เมษายน 2555
2. เสนอผลงานในการประชุม 52nd Interscience Conference of Antimicrobial Agent and Chemotherapy (ICAAC) ณ เมือง San Francisco, USA ระหว่างวันที่ 9-12 กันยายน 2555
3. บรรยายเรื่อง "Roles of Iron and Iron Chelators in Invasive Fungal Diseases" ในงานประชุม The Australasian Mycological Society Conference ณ Flecker Botanic Gardens เมือง Cairns, Queensland, Australia ระหว่างวันที่ 26 ถึง 28 กันยายน 2555
4. Manuscript อยู่ในระหว่างดำเนินการเพื่อตีพิมพ์ (ดูภาคผนวก)

ภาคผนวก

Original Article:

Impact of Iron Chelators on Growth and Expression of Iron-Related Genes of *Cryptococcus* species

Methee Chayakulkeeree, Teerawit Tangkoskul, Duangdao Waywa, Surapee Tiengrim, Suphiluck Onsomearng, Naruchapun pati, Visanu Thamlikitkul

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

Correspondence: Methee Chayakulkeeree

Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand

Phone: +662 4197783, Fax: +662 4197783, E-mail: methee.cha@mahidol.ac.th

Keywords: *Cryptococcus neoformans*, iron chelator, antifungal agent, cryptococcosis

Running head: Antifungal effect of iron chelators in *Cryptococcus*

ABSTRACT

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.

Introduction

Cryptococcus neoformans is an important opportunistic pathogen in patients with HIV/AIDS and those receiving immunosuppressive therapy and organ transplant recipients. It is one of the most common opportunistic infection in advanced HIV disease following tuberculosis and pneumocystosis (1). Although the access to antiretroviral therapy reduced the prevalence of opportunistic infection in HIV/AIDS (2), the number of patients with cryptococcal infection are still high. In fact, *Cryptococcus gattii* can also affect normal individuals. Although the guideline for treatment of cryptococcal diseases is available (3, 4), current antifungal agents used to combat cryptococcal infections are still limited resulting in a high morbidity and mortality (5). Seeking for novel therapy for cryptococcosis is therefore of important in order to improve treatment outcomes of patients with invasive cryptococcal diseases. Iron availability has been implicated as a major regulator of fungal growth and virulence. Sequestration of iron by serum is a major host defense mechanism against certain fungal pathogens that can inhibit growth of the fungus and this fungistasis effect is reversed when exogenous iron is added to the serum to increase transferrin saturation. The role of iron chelation on invasive fungal diseases has been investigated especially in mucormycosis. Before the availability of novel iron chelating agents, the benefit of iron chelation for treatment of invasive fungal diseases was obscured by the early observation that deferoxamine (DFO) therapy used for the treatment of iron/aluminium overload in dialysis patients was found to be a risk factor for angioinvasive mucormycosis. This paradoxical evidence of the increased risk of mucormycosis in DFO treatment is explained by the fact that DFO acts as a siderophore to supply previously unavailable iron to the fungus and enhances fungal growth. The discovery of novel iron chelators, deferasirox (DFX), has highlighted the potential use of iron chelation, alone or in combination with antifungal drugs, for

treatment of invasive fungal diseases (6). These newer tridentate iron chelators tightly bind the ferric ion and therefore do not act as siderophores as the fungi are incapable to detach iron from the iron-chelator complex (7). The effect of iron chelators in *Cryptococcus* spp. has never been investigated. We report here the antifungal activity of iron chelators and their potential role for treatment of invasive cryptococcosis.

Methods

Cryptococcal Strains: *C. neoformans* strain H99 (serotype A) and 8 reference strains of *C. neoformans* (WM626, WM148, WM629, WM628) and *C. gattii* (WM179, WM175, WM178, WM779) were used in this study. All reference strains were received as gifts from Dr. Weiland Meyer, Westmead Hospital, University of Sydney, Australia.

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and fractional inhibitory concentration (FIC): MIC of DFX, DFO, amphotericin B (AMB) and fluconazole in *C. neoformans* and *C. gattii* isolates was determined using broth microdilution test according to CLSI. The FIC of the combinations between the iron chelators (DFX and DFO) and amphotericin B (AMB) or fluconazole was performed using checker board method. FIC was calculated as following: $FIC = (MIC \text{ of drug A, tested in combination}) / (MIC \text{ of drug A, tested alone}) + (MIC \text{ of drug B, tested in combination}) / (MIC \text{ of drug B, tested alone})$.

Growth curves determination: Growth curves of yeast in exposure to DFX or DFO, with and without AMB, were performed using 10^5 cells of *C. neoformans* and *C. gattii* in YNB broth.

One-hundred milliliters of each broth culture were taken and plated onto sabouraud dextrose agar (SDA) in various dilution and colonies were counted after a 3-day incubation. The growth curve experiments were performed at both 30°C and 37°C.

Determination of capsule size: Cryptococcal strains were grown in YPD broth overnight. The yeast cells were visualized under a microscope and capsule:whole cell ratio was measured.

Semiquantitative RT-PCR of cryptococcal gene expression: *C. neoformans* strain H99 was grown in YNB with and without DFO in a shaking incubator at 30°C. The cell culture was taken at 12 hours after incubation. Cells were centrifuged and subjected to RNA extraction using Trizole (Invitrogen). cDNA was synthesized from the extracted RNA using SuperScript III (Invitrogen) and use as template for RT-PCR. Cryptococcal *CFT1*, *CFT2*, and *CIR1* gene expressions were determined using semi-quantitative real-time PCR (Biorad).

Results

MIC and FIC of antifungal agents and iron chelators

The MIC of amphotericin B to 9 *C. neoformans* and *C. gattii* reference strains (Table 1) and 9 clinical isolates (Table 2) were shown. All cryptococcal strains exhibited MIC of amphotericin B at 0.5-1 µg/ml and MIC of DFO and DFX > 200 µg/ml suggesting that the iron chelators itself do not have antifungal activity to cryptococcal isolates. For reference strains, when combined amphotericin B with DFO, the FIC was 0.5 whereas the combination of amphotericin B and DFX gave FIC of 1.0. These results suggested that there was synergistic effect between amphotericin B and DFO but not DFX (Table 1).

Table 1 (A.) MIC and FIC of amphotericin B and iron chelators against *C. neoformans* reference strains (B.) MIC and FIC of amphotericin B and iron chelators against *C. gattii* reference strains

• Agents / Organisms	MIC (µg/ml)				
	WM 626	H 99	WM 148	WM 629	WM 628
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200	>200	>200
Amphotericin B	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5
Amphotericin B + DFO	0.25 / 6.25	0.25 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
FICI of Amphotericin B + DFO	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

• Agents / Organisms	MIC (µg/ml)			
	WM 179	WM 175	WM 178	WM 779
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0	0.5
Amphotericin B + DFX	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5	1.0 / 12.5
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.25 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0	1.0	1.0	1.0
FICI of Amphotericin B + DFO	0.5	0.5	0.5	0.5

The amphotericin B MIC 15 *C. neoformans* clinical isolates (Table 2) were shown. Similarly to the reference strains, all cryptococcal strains exhibited MIC of amphotericin B at 0.5-1 µg/ml and MIC of DFO and DFX > 200 µg/ml. When combined amphotericin B with DFO, the FIC ranged between 0.5-0.8 whereas the combination of amphotericin B and DFX gave FIC of 1.1 in all isolates. These results suggested that there was synergistic effect between amphotericin B and DFO in cryptococcal clinical isolates (Table 2).

Table 2 MIC and FIC of amphotericin B and iron chelators against 15 *C. neoformans* clinical isolates

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT009	ICT015	ICT016
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.1	1.1	1.1
FICI of Amphotericin B + DFO	0.5	0.5	0.5

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT001	ICT003	ICT006
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	0.5	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.25 / 6.25	0.25 / 6.25	0.5 / 50
FICI of Amphotericin B + DFX	1.1	1.1	1.1
FICI of Amphotericin B + DFO	0.5	0.5	0.8

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT007	ICT008	ICT012
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 25	0.5 / 50	0.5 / 12.5
FICI of Amphotericin B + DFX	1.1	1.1	1.1
FICI of Amphotericin B + DFO	0.6	0.8	0.6

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT013	ICT017	ICT020
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.5	0.5	0.5

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	ICT021	ICT023	ICT029
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Amphotericin B	1.0	1.0	1.0
Amphotericin B + DFX	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Amphotericin B + DFO	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25	0.5 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.0625	1.0625	1.0625
FICI of Amphotericin B + DFO	0.5	0.5	0.5

Fluconazole MICs of 2 *C. neoformans* (H99 and WM626) and a *C. gattii* (WM178) were determined. In contrast to amphotericin B, fluconazole did not show synergistic activity with any iron chelator with the FIC of 1.1 µg/ml (Table 3).

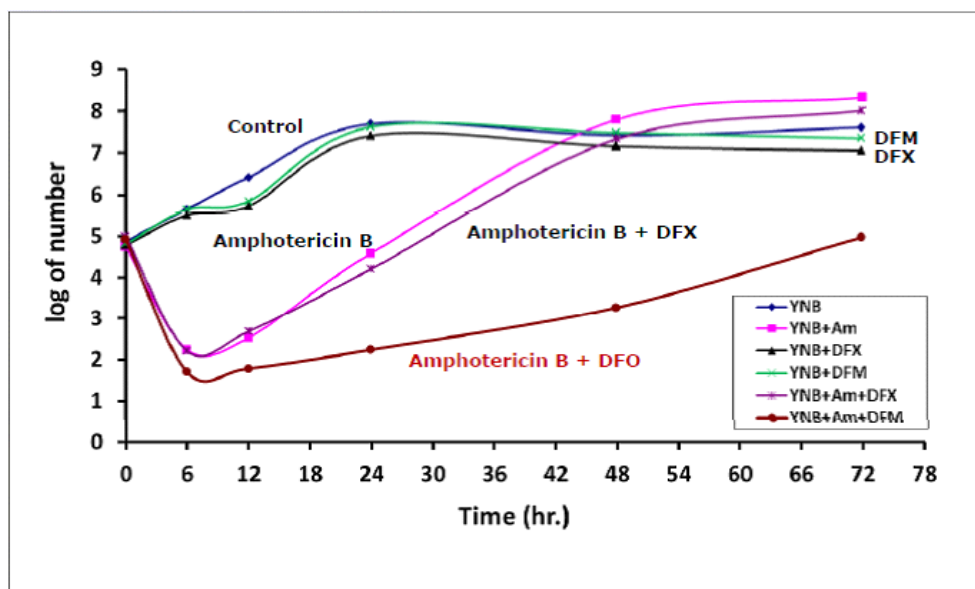
Table 3 MIC and FIC of fluconazole and iron chelators against *C. neoformans* and *C. gattii*

Agents / Organisms	MIC (µg/ml)		
	H 99	WM 178	WM 626
Deferasirox (DFX)	>200	>200	>200
Deferoxamine (DFO)	>200	>200	>200
Fuconazole	2.0	8.0	1.0
Fuconazole + DFX	2.0 / 6.25	8.0 / 6.25	1.0 / 6.25
Fuconazole + DFO	2.0 / 6.25	8.0 / 6.25	1.0 / 6.25
FICI of Amphotericin B + DFX	1.1	1.1	1.1
FICI of Amphotericin B + DFO	1.1	1.1	1.1

Growth curves of *C. neoformans* serotypes A and D were determined. The results confirmed that when amphotericin B was combined with DFO, but not DFX, it can slow the growth of *C. neoformans* (Figure 1). However, the growth retardation was less obvious in *C. gattii* (serotype B and C) (Figure 2).

Figure 1 Growth curves of *C. neoformans* (serotype A and D) growing in YNB broth supplemented with amphotericin, DFX, DFO and combination of amphotericin B with DFX or DFO

Serotype A



Serotype D

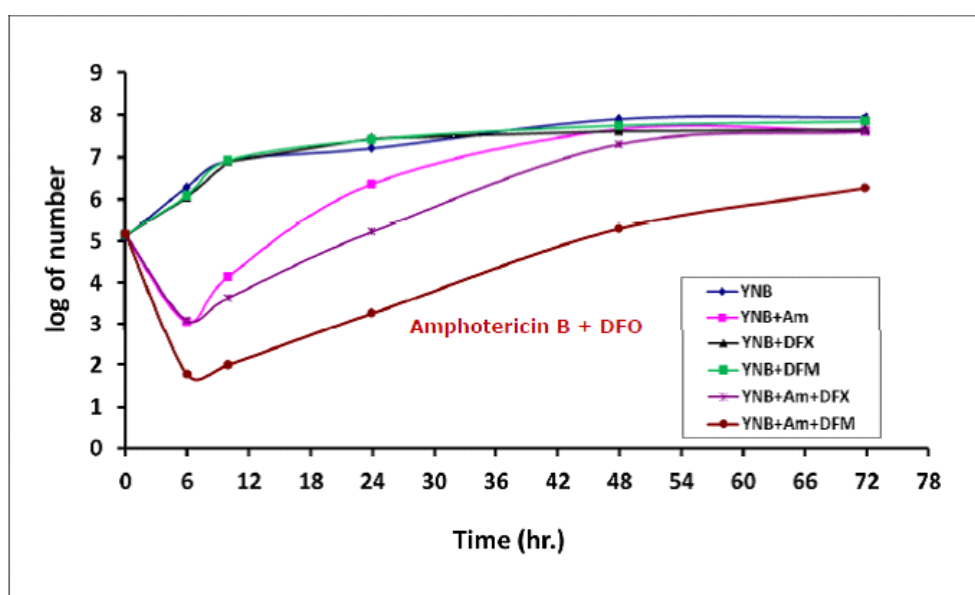
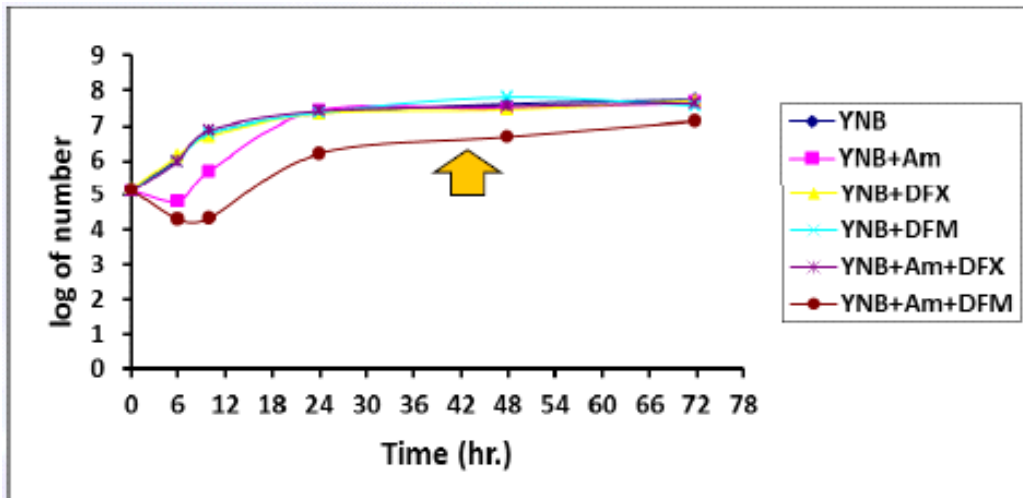
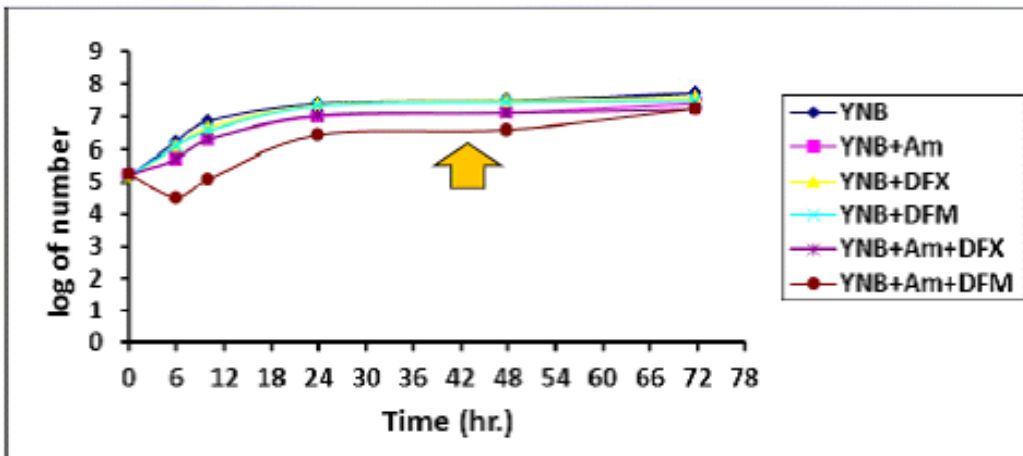


Figure 2 Growth curves of *C. gattii* (serotype B and C) growing in YNB broth supplemented with amphotericin, DFX, DFO and combination of amphotericin B with DFX or DFO

Serotype B

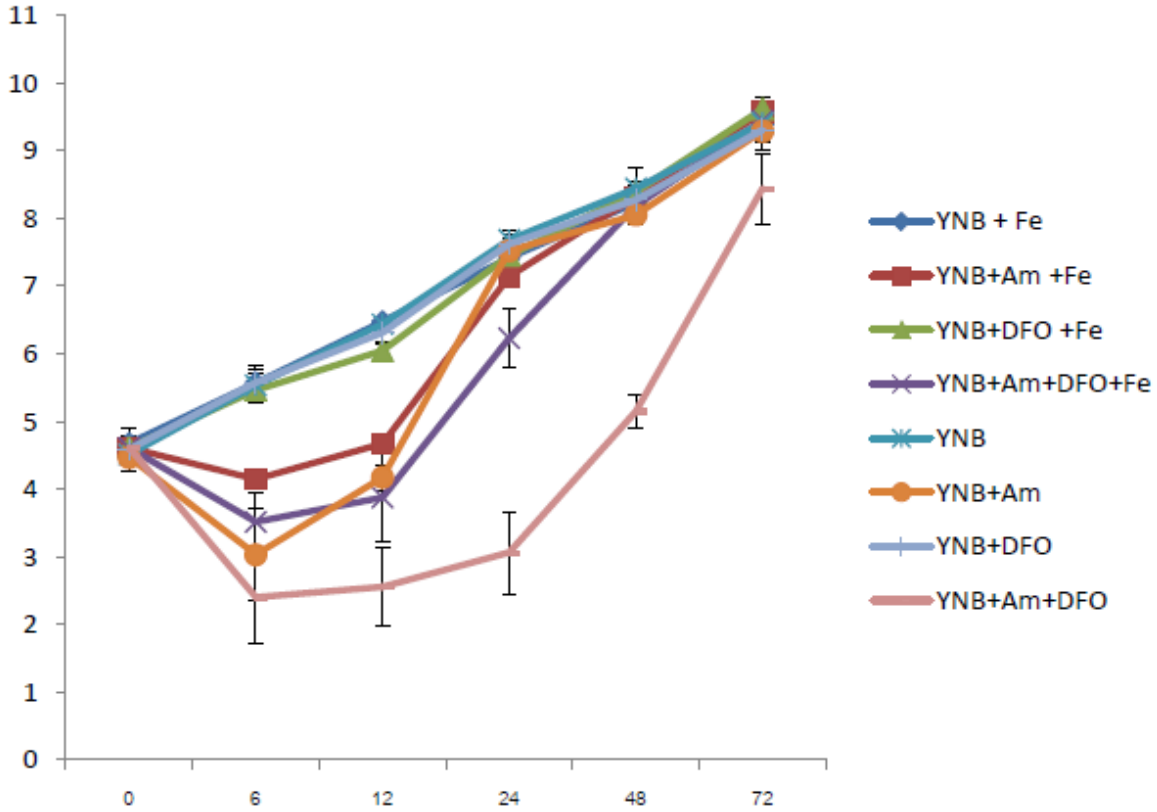


Serotype C



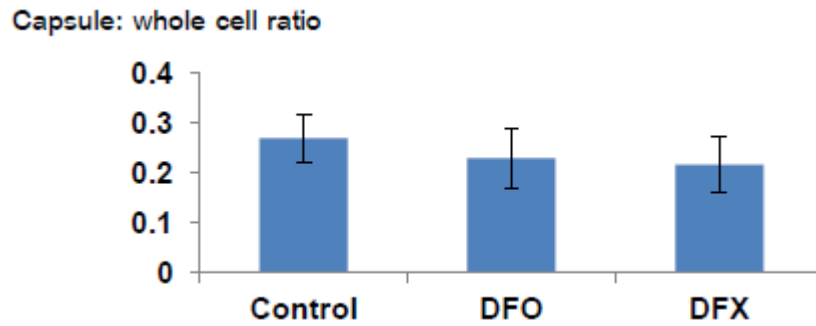
When iron was added into the YNB culture medium with amphotericin B and DFO, the effect on growth retardation was abolished (Figure 3).

Figure 3 Growth curves of *C. neoformans* growing in YNB broth supplemented with amphotericin, DFX, DFO and combination of amphotericin B with DFX or DFO. Growth retardation effect was abolished when iron was added into the medium (purple line).



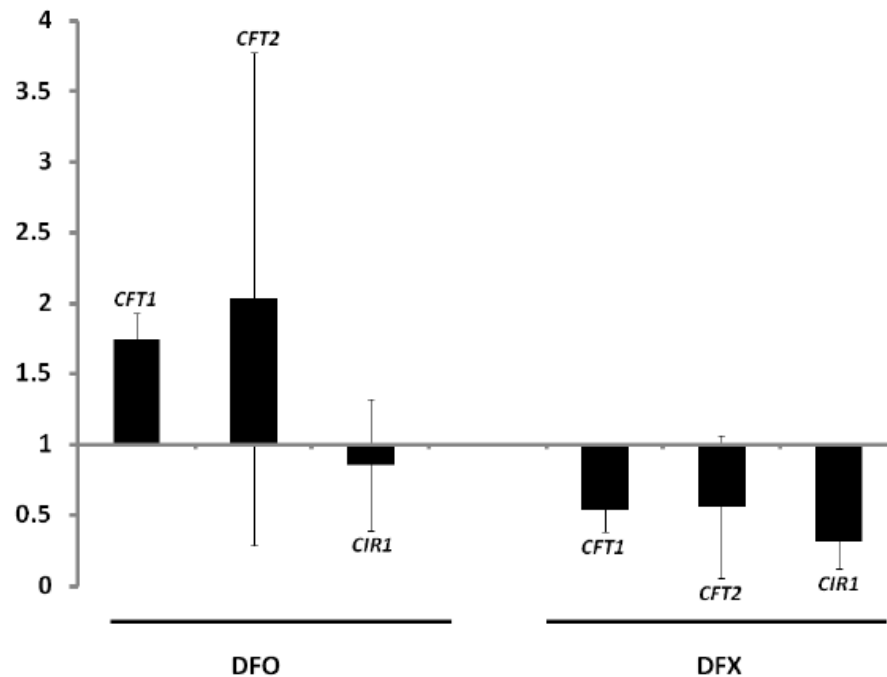
We investigated the effect of iron chelators on a virulence factor of *C. neoformans*, which is the fungal capsule. There was no difference of capsule:whole cell ratio of the yeast cells when exposed to DFX or DFO. This result suggested that iron chelators had no impact on cryptococcal capsule (Figure 4). In addition, iron chelator did not affect growth at physiologic temperature (37°C) of cryptococcal strains (data not shown)

Figure 4 *C. neoformans* was grown in YNB with and without DFX or DFO. Mean capsule:whole cell ratio of was determined (error bar = standard deviation).



To demonstrate the effect of iron chelators on iron-related genes, *CFT1*, *CFT2* and *CIR1*, cDNA was synthesized from RNA extracted from *C. neoformans* grown in YNB with or without DFX or DFO. Results showed that *CIR1* was more up-regulated when the cells were grown with DFX (Figure 5).

Figure 5 Gene expression ของ *C. neoformans* (serotype A) grow in medium with or without DFX or DFO. *CFT1*, *CFT2* and *CIR1* expression was determined by semi-quantitative RT-PCR.



Discussion

It has been shown that there is an association between iron overload and invasive fungal diseases implicating the role of iron in fungal growth and pathogenesis (8, 9). Human body possesses a mechanism to maintain iron at a low level and it has shown to have inhibitory effects to fungi (10). Previous study showed that *Cryptococcus neoformans* possesses iron machinery involved *CFT1* and *CFT2* genes for iron transport and *CIR1* genes for iron regulation (11-13). *CFT1* and *CIR1* have been shown to be a virulence factors in *C. neoformans* and *CIR1* appears to be a regulatory unit for several cryptococcal virulence determinants including growth at high

temperature, melanin pigment, capsular polysaccharide and phospholipases. Animal studies also revealed that *CFT1* and *CIR1* play a pivotal role in cryptococcal pathogenicity.

Our results showed that, when combined with amphotericin B, DFO are synergistic to the polyene antifungal agent. However, the triazole, fluconazole did not show additional antifungal activity when combined with DFO. This may explain by the different antifungal mechanism between amphotericin B and fluconazole in which amphotericin B exhibits a direct fungal cell membrane disruption. In addition, our result revealed that, unlike other fungi such as Zygomycetes, DFX does not have additional antifungal activity when combined with amphotericin B. These findings suggested that there are different mechanisms in iron acquisition and action of iron chelators in yeasts and molds. In fact, the synergistic activity was more robust in *C. neoformans* than that in *C. gattii*, suggesting that there are also different in iron metabolism and fungal virulence, even in the same genus. The higher expression of *CFT1* and *CFT2* in condition with DFO infers that there cryptococcal iron transporter genes increased their activity in order to adapt itself in response to iron deficiency caused by DFO, but not DFX.

In conclusion, the iron chelator, DFO, exhibits synergistic effect to amphotericin B against *C. neoformans* and *C. gattii*. However, marked growth retardation was shown only in *C. neoformans*. The extent of synergistic effect between DFO and AMB was more than that of DFX and AMB and this is different to Zygomycetes in which DFO enhances, rather than inhibits, fungal growth. Overexpressions of *CFT1* and *CFT2* seem to be the major compensatory mechanism to increase iron acquisition in DFO-treated cryptococcal cells. Finally, DFO in combination with AMB may be a potential combination antifungal therapy in cryptococcosis in resource-limited countries where flucytosine is not available. Further in vivo and clinical studies are therefore warranted.

Acknowledgement

This study received funding support from Thailand Research Fund (TRF).

References

1. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health.
2. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS*. 2004 Feb 20;18(3):555-62.
3. Mussini C, Pezzotti P, Miro JM, Martinez E, de Quiros JC, Cinque P, et al. Discontinuation of maintenance therapy for cryptococcal meningitis in patients with AIDS treated with highly active antiretroviral therapy: an international observational study. *Clin Infect Dis*. 2004 Feb 15;38(4):565-71.
4. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis*. Feb 1;50(3):291-322.
5. Chayakulkeeree M, Perfect JR. Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2006 Sep;20(3):507-44, v-vi.
6. Ibrahim AS, Gebermaria T, Fu Y, Lin L, Hussein MI, French SW, et al. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2649-57.
7. Ibrahim AS, Spellberg B, Edwards J, Jr. Iron acquisition: a novel perspective on mucormycosis pathogenesis and treatment. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Dec;21(6):620-5.

8. Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, Ward CG. Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. *J Med Microbiol.* 2006 Mar;55(Pt 3):251-8.
9. Iglesias-Osma C, Gonzalez-Villaron L, San Miguel JF, Caballero MD, Vazquez L, de Castro S. Iron metabolism and fungal infections in patients with haematological malignancies. *J Clin Pathol.* 1995 Mar;48(3):223-5.
10. Symeonidis AS. The role of iron and iron chelators in zygomycosis. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Oct;15 Suppl 5:26-32.
11. Jung WH, Kronstad JW. Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*. *Cell Microbiol.* 2008 Feb;10(2):277-84.
12. Jung WH, Sham A, Lian T, Singh A, Kosman DJ, Kronstad JW. Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 2008 Feb 8;4(2):e45.
13. Jung WH, Sham A, White R, Kronstad JW. Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Biol.* 2006 Nov;4(12):e410.