

# Đánh giá hoạt tính kháng nấm của (-)-cercosporamid trên một số chủng nấm *Candida albicans*

Trần Thị Vân Anh<sup>1</sup>, Trần Khắc Vũ<sup>2</sup>, Phạm Quốc Tuấn<sup>1</sup>  
Hà Thanh Hoà<sup>1</sup>, Trần Phương Thảo<sup>3</sup>, Đào Việt Hưng<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup> Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ

Viện Kỹ thuật Hóa học, Đại học Bách Khoa Hà Nội

<sup>3</sup> Trường Đại học Dược Hà Nội

<sup>4</sup> Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, France

## Summary

(-)-Cercosporamide is a natural product isolated from the phytopathogen fungus *Cercosporidium henningsii*. It was identified as a potent CaPkc1 ATP-competitive inhibitor. In this study, the antifungal activity of (-)-cercosporamide was evaluated on some strains of the fungus *Candida albicans* based on EUCAST method. The results showed inhibitory activity on three strains of pathogenic fungi *Candida albicans* (CAAL 93, CAAL 97, CAAL 2), with IC<sub>50</sub> value of 100 μM.

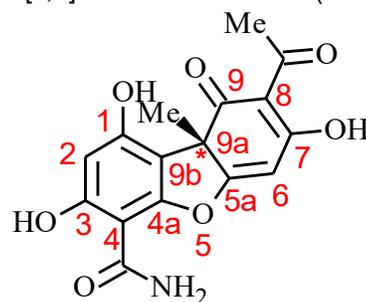
**Keywords:** (-)-Cercosporamide, antifungal activity, *Candida albicans*, fluconazol.

## Đặt vấn đề

Nấm *Candida* bao gồm các loại nấm cơ hội, là một trong những loài sinh vật gây bệnh nhiễm trùng đường huyết. Bệnh nấm *Candida* huyết có tỷ lệ tử vong cao (có nơi lên tới 67 %), thời gian nằm viện kéo dài và chi phí điều trị tốn kém [1]. Hiện nay, 70 % ca sốc nhiễm trùng huyết nhập viện là do loài *C. albicans* và 22 % do các loài không phải *C. albicans* [2]. Các nhóm thuốc điều trị nấm *Candida* hiện nay không nhiều, bao gồm các nhóm: polyen, fluoropyrimidin, azol, allylamin và echinocandin [3]. Các thuốc trên tác động theo 3 cơ chế: ức chế sự sinh tổng hợp ergosterol của màng tế bào nấm (nhóm polyen, azol và allylamin), ngăn cản quá trình tổng hợp ADN và ARN trong nấm (nhóm fluoropyrimidin) và làm rối loạn quá trình hình thành tế bào nấm (nhóm echinocandin) [3]. Thực tế số lượng các thuốc được lựa chọn dùng trong điều trị bệnh nhiễm nấm, đặc biệt bệnh nhiễm nấm huyết do *Candida* còn hạn chế; thêm vào đó việc sử dụng thuốc lặp lại và chưa hợp lý là nguyên nhân dẫn đến tái phát bệnh và phát triển các chủng nấm kháng thuốc [4]. Do đó, sự phát triển liệu pháp mới điều trị bệnh nhiễm nấm, đặc biệt việc

xác định các chất mới có khả năng chống nấm ở nồng độ thấp hoặc kết hợp luôn được quan tâm chú trọng.

(-)-Cercosporamid là một sản phẩm tự nhiên, được phân lập vào năm 1991 từ môi trường nuôi cấy loài nấm gây bệnh trên thực vật *Cercosporidium henningsii*. Hợp chất này có cấu trúc dibenzo[*b,d*]furan với danh pháp: (9a*S*)-8-acetyl-9,9a-dihydro-1,3,7-trihydroxy-9a-metyl-9-oxodibenzo[*b,d*]furan-4-cacboxamid (hình 1) [5].



**Hình 1.** Cấu trúc của (-)-cercosporamid

Năm 2004, Sussman và CS. đã nghiên cứu cho thấy (-)-cercosporamid là chất ức chế mạnh đối với protein kinase của nấm *C. albicans* (CaPkc1), một protein có vai trò quan trọng trong việc hình thành đặc tính tăng trưởng cũng như các hiện tượng kháng thuốc chống nấm của các loài *C. albicans*, với giá trị IC<sub>50</sub> là 44 nM [6]. Với mục tiêu tìm kiếm các chất có hoạt tính kháng nấm tiềm năng, trong nghiên cứu này,

Chịu trách nhiệm: Đào Việt Hưng

Email: daoviethung@live.com

Ngày nhận: 11/5/2021

Ngày phân biện: 19/5/2021

Ngày duyệt bài: 26/7/2021

chúng tôi đã thực hiện đánh giá tác dụng kháng nấm của (-)-cercosporamid trên 6 chủng *C. albicans* (CAAL): 2 chủng nhạy cảm với fluconazol và 4 chủng kháng fluconazol.

### Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

#### Hóa chất, vật liệu và trang thiết bị

Chất thử nghiệm (-)-cercosporamid được chiết xuất từ môi trường nuôi cấy loài nấm *Mycosphaerella henningsii* do phòng thí nghiệm MMS - Đại học Nantes cung cấp. Hoạt chất kháng nấm sử dụng fluconazol (HiMedia)

được sử dụng làm chất đối chiếu. Các hóa chất, dung môi được mua từ các nhà cung cấp (Aldrich, Merck, Acros) với độ tinh khiết trên 98 %. Các chủng nấm nghiên cứu do phòng thí nghiệm IICiMed - Đại học Nantes cung cấp, bao gồm: 2 chủng nhạy cảm với fluconazol: CAAL 93 và CAAL 97 và 4 chủng kháng fluconazol: CAAL 2, CAAL 28, CAAL 111 và CAAL 117 (bảng 1). Chất chỉ thị là resazurin do Viện Roscoff (Pháp) cung cấp. Nồi hấp tiệt trùng Hirayama, tủ ẩm Shellab, máy vortex Labnet, tủ cấy vô trùng, máy đo quang Gene Quant.

**Bảng 1. Nguồn gốc và đặc điểm của các chủng nấm nghiên cứu**

Chủng nấm	Nguồn gốc	Nhạy cảm/kháng fluconazol	Cơ chế kháng fluconazol
CAAL93	Bệnh viện đại học Nantes, Pháp	Nhạy cảm	-
CAAL97	Viện nghiên cứu Pasteur, Pháp	Nhạy cảm	-
CAAL2	Bệnh viện đại học Nantes, Pháp	Kháng	Đột biến trên <i>erg3</i>
CAAL28	Bệnh viện đại học Nantes, Pháp	Kháng	Đột biến trên <i>erg11</i>
CAAL111	Phòng thí nghiệm IICiMed - Đại học Nantes, Pháp	Kháng	Đột biến trên <i>CDR1/ CDR2</i>
CAAL117	Phòng thí nghiệm IICiMed - Đại học Nantes, Pháp	Kháng	Đột biến trên <i>erg11</i> và <i>MDR1</i>

### Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm

Thử tác dụng kháng nấm độc lập của (-)-cercosporamid được thực hiện tại phòng thí nghiệm IICiMed bằng phương pháp EUCAST được sửa đổi cho phù hợp với nghiên cứu [7]. (-)-Cercosporamid được thử tác dụng kháng nấm trên 6 chủng nấm. Giá trị IC<sub>50</sub> của (-)-cercosporamid được tính dựa trên kết quả thu được sau 3 lần tiến hành thí nghiệm độc lập so sánh với IC<sub>50</sub> của chủng dương fluconazol. Dải nồng độ sử dụng của (-)-cercosporamid trong nghiên cứu này dựa trên nghiên cứu trước đây của Lafayette et al. để đánh giá tác dụng trên các chủng nấm tương ứng là 3 µM, 30 µM và 300 µM [8]. Dải nồng độ sử dụng để đánh giá tác dụng trên các chủng nấm của fluconazol tương ứng là 1 µM, 10 µM và 100 µM (hình 2). Các thử nghiệm được thực hiện trong phiên cấy phẳng 96 giếng. Sử dụng môi trường nuôi cấy lỏng RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (2 % glucose, bổ sung dung dịch đệm acid 3-N-morpholinopropanesulfonic (MOPS) 0,0165 M để dung dịch đạt pH 7.

### Thực nghiệm và kết quả

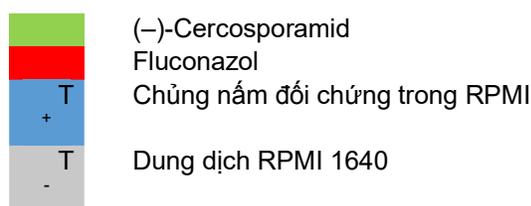
#### Thiết kế kiểm tra hoạt tính kháng nấm của (-)-cercosporamid

Đầu tiên các chất thử được hoà tan trong dimethylsulfoxid (DMSO) tạo dung dịch gốc có nồng độ 30 mM đối với (-)-cercosporamid và 10 mM đối với chất đối chiếu fluconazol. Tiếp theo các chất thử được pha loãng với DMSO ở các nồng độ 0,3 mM đối với (-)-cercosporamid và 0,1 mM đối với chất đối chiếu fluconazol. Sau đó, các chất thử được pha loãng bằng môi trường RPMI lỏng ở các nồng độ 300 µM, 30 µM và 3 µM đối với (-)-cercosporamid và 100 µM, 10 µM và 1 µM đối với chất đối chiếu fluconazol. 100 µL của mỗi dung dịch này trong RPMI được phân phối lặp lại ba lần trong phiên 96 giếng. Sau khi chuẩn bị, các phiên được bảo quản ở -80 °C. Các chủng nấm *C. albicans* được nuôi cấy trên môi trường Sabouraud trong 24 giờ ở 37 °C. Sau đó, chuẩn bị các hỗn dịch của các chủng nấm *C. albicans* trong hỗn hợp huyết thanh sinh lý/tween 80 (0,01 %) và lắc vortex để đồng nhất hoá. Việc định lượng hỗn dịch được thực hiện trên buồng đếm tế bào

Malassez để có thể thực hiện pha loãng thích hợp đảm bảo mật độ nấm đạt khoảng  $10^4$  tế bào nấm/mL. 100  $\mu$ L hỗn dịch này được phân phối vào mỗi giếng của phiến có chất thử đã chuẩn bị trước ở nhiệt độ phòng và được ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Resazurin (10  $\mu$ L, 700  $\mu$ M) được thêm vào mỗi giếng sau đó tiếp tục ủ ở 37 °C trong khoảng 3 giờ cho phép đo cường độ

huỳnh quang để định lượng chính xác số lượng tế bào sống trong mỗi giếng. Trong quá trình ủ, resazurin (màu xanh lam) bị các tế bào sống sót khử thành resorufin (màu hồng). Resorufin là một phân tử huỳnh quang (hấp thụ ở bước sóng 550 nm và phát xạ ở bước sóng 590 nm). Phép đo huỳnh quang sau đó được thực hiện bằng máy quang phổ kế.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	T <sup>+</sup>	
	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	T <sup>+</sup>	
	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	T <sup>+</sup>	
	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	T	
	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	T	
	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	300 $\mu$ M	T	



Hình 2. Thiết kế phiến đáy phẳng 96 giếng để kiểm tra hoạt tính chống nấm

**Kết quả thử tác dụng kháng nấm C. Albicans của (-)-cercosporamid**

Kết quả thử tác dụng kháng nấm độc lập của

(-)-cercosporamid và fluconazol được trình bày trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2. Tác dụng kháng nấm của (-)-cercosporamid và fluconazol

Chất	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)*					
	CAAL93	CAAL97	CAAL2	CAAL28	CAAL111	CAAL117
(-)-Cercosporamid	103,2 ± 23,2	93,3 ± 18,5	90,1 ± 11,3	> 300	> 300	> 300
Fluconazol	0,14 ± 0,07	0,19 ± 0,11	> 100	> 100	> 100	> 100

**Ghi chú:** \* Nồng độ ức chế 50% sự phát triển nấm là trung bình của ba thao tác độc lập và nằm trong phạm vi ± 15% SD. IC<sub>50</sub> được xác định bằng phần mềm TableCurve 2Dv4.

Kết quả trình bày ở bảng 2 cho thấy các giá trị IC<sub>50</sub> thu được đối với fluconazol trên các chủng nấm thử: khoảng 0,2 µM đối với các chủng nhạy cảm và > 100 µM đối với các chủng kháng. Trong khi đó, (-)-cercosporamid thể hiện giá trị IC<sub>50</sub> khoảng 100 µM trên hai chủng nhạy cảm và một chủng kháng CAAL2. Đối với ba chủng kháng fluconazol CAAL28, CAAL111, CAAL117, không có giá trị IC<sub>50</sub> nào tính được ở các liều thử nghiệm (-)-cercosporamid. Nguyên nhân có thể do (-)-cercosporamid không gắn được vào đích tác dụng, hoặc do nồng độ (-)-cercosporamid thử nghiệm không đủ để tạo ra hoạt tính kháng nấm, hoặc việc ức chế CaPkc1 không đủ để tạo ra hoạt tính kháng nấm. Kết quả này tạo tiền đề, định hướng nhóm nghiên cứu tiếp tục tập trung đánh giá hoạt tính kháng nấm của (-)-cercosporamid trên các chủng khác của *C. albicans* đồng thời nghiên cứu các cơ chế tác dụng khác của (-)-cercosporamid trên các chủng nhạy cảm.

#### Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành đánh giá hoạt tính kháng nấm của (-)-cercosporamid trên 6 chủng *C. albicans* (2 chủng nhạy cảm fluconazol: CAAL 93 và CAAL 97 và 4 chủng kháng fluconazol: CAAL 2, CAAL 28, CAAL 111 và CAAL 117). Kết quả cho thấy (-)-cercosporamid có khả năng ức chế sự phát triển trên hai chủng nhạy cảm và một trong những chủng kháng, với giá trị IC<sub>50</sub> khoảng 100 µM.

*Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia Việt Nam (NAFOSTED) theo tài trợ số 10/2020/STS01; chương trình học bổng 911; Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ; Phòng thí nghiệm Hóa học trị liệu – IICiMed của Đại học Nantes – Pháp; Sở Khoa học và Công nghệ tỉnh Phú Thọ.*

#### Tài liệu tham khảo

1. Benedict K., Jackson B.R., Chiller T., et al. (2019), "Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States", *Clin Infect Dis*, 68 (11), pp. 1791–1797.
2. Delaloye J. and Calandra T. (2014), "Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient", *Virulence*, 5 (1), 161–169.
3. Oliveira Santos G. C., Vasconcelos C. C., Lopes A. J. O., et al. (2018), "Candida infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents", *Front Microbiol*, 9.
4. Roemer T. and Krysan D. J. (2014), "Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches", *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4 (5).
5. Sugawara F., Strobel S., Strobel G., et al. (1991), "The structure and biological activity of cercosporamide from *Cercosporidium henningsii*", *J. Org Chem.*, 56 (3), 909–910.
6. Sussman A., Huss K., Chio L.-C., et al. (2004), "Discovery of cercosporamide, a known antifungal natural product, as a selective pkc1 kinase inhibitor through high-throughput screening", *Eukaryot Cell*, 3 (4), 932–943.
7. Meletiadi J., Curfs-Breuker I., Meis J. F., et al. (2017), "In vitro antifungal susceptibility testing of candida isolates with the eucast methodology, a new method for ecoff determination", *Antimicrob Agents Chemother*, 61 (4).
8. LaFayette S. L., Collins C., Zaas A. K., et al. (2010), "PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, Calcineurin, and Hsp90", *PLOS Pathog*, 6 (8), e1001069.