

การศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อแสดงศักยภาพของควอลัมเซนซิงโมเลกุลจากเชื้อราชนิดทริปโตปอล (Tryptophol) ในการต้านการเจริญของเชื้อรากลุ่มดื้อยาต้านเชื้อรา

วัชรมาศ ม่วงแก้ว¹ ณิชชา เรือนมูล² พรพรรณ ขำเอี่ยม¹ ธิติพันธ์ กิตติสิน¹ ภัสนศวรร สุขโพธิ์เพชร¹

¹ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

²โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

Received: April 8, 2022

Revised: May 16, 2022

Accepted: July 28, 2022

บทคัดย่อ

เชื้อรากลุ่ม *Candida* spp. และ *Aspergillus* spp. มีอัตราการดื้อยาหรือการตอบสนองต่อยาต้านเชื้อราชนิด Azole เพิ่มขึ้นจากการศึกษา tryptophol เป็น fungal quorum sensing molecules ที่มีบทบาทต่อการเจริญของเชื้อรา จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของสาร tryptophol ที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยการศึกษาวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อพิจารณาศักยภาพของสาร tryptophol ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยากลุ่ม azole และศึกษาความเป็นพิษของ tryptophol ในความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole ในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากการทดลองผลของการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม Azole พบว่าค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ได้ อยู่ที่ 2 และ 8 mM ตามลำดับ เมื่อนำความเข้มข้นของ tryptophol มาทดสอบความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โดยอาศัยเทคนิค MTT Assay พบว่าที่ความเข้มข้น 2 และ 4 mM ไม่เป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ มีร้อยละของการมีชีวิตอยู่ที่ 113.86 ± 9.34 และ 105.08 ± 13.66 ตามลำดับ และเริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 8 mM จากการทดสอบการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ด้วยวิธี Ethidium bromide-Acridine orange staining assay พบว่าที่ 2 และ 4 mM มีการเกิด apoptosis อยู่ที่ 46 และ 40.2% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 8-64 mM มีการเกิด apoptosis อยู่ที่ 100% และค่า Relative ratio ของ tryptophol ที่นำมากระตุ้นเซลล์ไฟโบร بلاสต์ พบว่าการแสดงออกของยีน caspase-8 และ CARD-9 ลดลงที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 2 และ 4 mM และเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8-64 mM จากผลที่ได้ พบว่าความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8 mM เป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดที่ตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม Azole แต่ยังมีข้อจำกัดของ Tryptophol ที่มีผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์

คำสำคัญ: ควอลัมเซนซิงโมเลกุลเชื้อรา ทริปโตปอล เซลล์ไฟโบร بلاสต์ ความเป็นพิษต่อเซลล์

ผู้สนับสนุนผลงาน:

ภัสนศวรร สุขโพธิ์เพชร

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

420/6 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400

อีเมล: natthanej.lup@mahidol.ac.th

In vitro effects of quorum sensing molecules (Tryptophol) on the growth of antifungal drug-resistant fungi

Watcharamat Muangkaew¹, Nicha Ruenmul², Pornpan Khum-em¹, Thitinan Kitisin¹, Passanesh Sukphopetch¹

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

²Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Abstract

Human pathogenic fungi such as *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. have been shown to increase the frequency of antifungal resistance, especially in the Azole group. The previous study found that tryptophol, which is classified as fungal quorum sensing molecules (QSMs), plays a role in fungal growth inhibition. Therefore, in the present study aimed to investigate the potential of tryptophol to control the growth of both drug susceptibility and Azole resistant strains of *C. albicans* and *A. fumigatus* *in vitro*, as well as to evaluate the inhibitory concentration of tryptophol on the cytotoxicity of fibroblast cells. This study results showed that tryptophol at the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 2 mM and 8 mM was able to inhibit the growth of *C. albicans* and *A. fumigatus*, respectively. In addition, tryptophol at concentrations of 2 mM and 4 mM did not cause damage to mitochondria and cytotoxicity after treatment with fibroblast cells by MTT Assay. The percentage of cell viability was $113.86 \pm 9.34\%$ and $105.08 \pm 13.66\%$, respectively. However, tryptophol at a concentration of 8 mM can produce a cytotoxic effect. When examining the apoptosis of fibroblast cells using Ethidium Bromide-Acridine Orange Staining Assay, we found that tryptophol at concentrations of 2 mM and 4 mM was able to induce fibroblast apoptosis by 46% and 40.2%, respectively. Tryptophol at concentrations of 8 to 64 mM and was able to induce 100% of fibroblast cell apoptosis. Moreover, tryptophol at concentrations of 2 mM and 4 mM was able to down-regulate the expression of *Caspase-8* and *CARD-9* genes and to up-regulate the *Caspase-8* and *CARD-9* genes when treated at concentrations of 8 to 64 mM. From the results, this study showed that the tryptophol at a concentration of 8 mM was capable of inhibiting growth both drug susceptibility and Azole resistant strains of *C. albicans* and *A. fumigatus*. However, the utilization of tryptophol is limited to fibroblast cells in the induction of cell apoptosis.

Keywords: fungal quorum sensing molecules, tryptophol, fibroblast cells, cytotoxicity cells

Corresponding Author:

Passanesh Sukphopetch

Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

420/6 Ratchawithi Road, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand.

E-mail: natthanej.lup@mahidol.ac.th

บทนำ

เชื้อราจัดเป็นกลุ่มจุลชีพที่สามารถก่อโรคได้ทั้งมนุษย์ สัตว์ และพืช เมื่อมีการติดเชื้อราเกิดขึ้น นอกจากจะส่งผลต่อระบบต่างๆ ที่ติดเชื้อ ยังส่งผลต่อรูปลักษณ์ (cosmetic concerned) ได้แก่ เกิดรอยต่างของผิว ตุ่มหนอง ตุ่มนูนแข็ง ผื่น ร่วง เล็บร่น เป็นต้น รวมถึงผลกระทบทางเศรษฐกิจ (economic concerned) ได้ เพราะการรักษาผู้ติดเชื้อราต้องใช้ยาที่มีราคาค่อนข้างแพงและใช้ระยะเวลานานในการรักษา¹⁻²

โรคติดเชื้อรา (fungal infection) อาจเกิดจากการติดเชื้อในชุมชน (community-acquired) หรือการติดเชื้อในโรงพยาบาลได้ ส่วนใหญ่มักเกิดในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันผิดปกติ เช่น ผู้ป่วยที่ได้รับยาเคมีบำบัดในการรักษาโรคมะเร็ง ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่ได้รับยาปลูกถ่ายอวัยวะหรือปลูกถ่ายไขกระดูก ผู้ป่วยเบาหวาน หรือผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส HIV ซึ่งจะติดเชื้อราฉวยโอกาส (opportunistic fungal pathogens) เช่น *Aspergillus* spp., *Cryptococcus neoformans* เชื้อราบางชนิดอาจก่อโรคในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันปกติได้ (primary pathogenic fungi) เช่น *Cryptococcus gattii* หรือเชื้อราก่อโรคประจำถิ่น (endemic fungal pathogens) เช่น *Candida* spp., *Talaromyces (Pencillium) marneffeii*, *Histoplasma capsulatum* เป็นต้น³⁻⁵ ในปัจจุบันยังพบว่าผลกระทบจากการใช้ยาต้านจุลชีพแบบไร้การควบคุมส่งผลให้มีจุลชีพดื้อยาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งกลุ่มเชื้อราที่พบว่ามีดื้อยาเพิ่มมากขึ้นอย่างชัดเจนจนส่งผลกระทบต่อผู้ติดเชื้อที่ต้องเสียชีวิตเพิ่มมากขึ้นคือเชื้อราในกลุ่ม *Candida* spp. และ *Aspergillus* spp.⁴⁻⁵ และพบว่าในประเทศไทยมีการรายงานการติดเชื้อ *Aspergillus* spp. และ *Candida* spp. ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันผิดปกติ ตลอดจนผู้ป่วยที่มีประวัติการนอนติดเตียงเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการรายงานการติดเชื้อราทั้งสองชนิด

ดังกล่าว มีอัตราการดื้อยาหรือการตอบสนองต่อยาต้านเชื้อราชนิด azole เพิ่มมากขึ้น

เชื้อราชนิดแคนดิดา (*Candida* spp.) จัดเป็นเชื้อราในกลุ่มยีสต์ หรือสาหร่าย ซึ่งพบว่าเป็นกลุ่มเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคทั้งชนิดที่ไม่รุนแรงคือ การติดเชื้อที่บริเวณผิวหนังหรือเยื่อ (mucocutaneous infection) จนถึงกลุ่มที่รุนแรงส่งผลให้ผู้ติดเชื้อเสียชีวิตได้ ซึ่งจัดเป็นหนึ่งในจุลชีพก่อให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic fungal infection) นั่นเอง⁶ ปัจจุบันพบว่าเชื้อแคนดิดานั้นมีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น โดยกลไกของการดื้อยามีหลายกลไก เช่น reduced drug intracellular accumulation, decreased target affinity/processivity for the drug หรือ counteraction of the drug effect เป็นต้น โดยพบว่าเชื้อแคนดิดาสวนมากที่มีรายงานการดื้อยาคือกลุ่มยาชนิด azole ซึ่งเป็นยามาตรฐานที่ใช้สำหรับการรักษาโรคติดเชื้อแคนดิดานั้นเอง ยิ่งในกลุ่มผู้ป่วยเอดส์ พบว่ามีการดื้อยาหรือการไม่ตอบสนองต่อยาชนิด azole เพิ่มมากขึ้น จนทำให้ต้องมีการปรับเปลี่ยนการใช้ยาเป็นกลุ่ม echinocandin ซึ่งมีราคาแพง และยังพบว่าเริ่มมีรายงานการดื้อยากลุ่ม echinocandin บ้างในบางประเทศ⁷ รายงานการดื้อยากลุ่ม azole ที่พบบ่อยในกลุ่มเชื้อแคนดิดา คือ *C. albicans* และกลุ่ม non-albicans *Candida* species ได้แก่ *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* และ *C. glabrata*⁸⁻⁹

สำหรับเชื้อ *Aspergillus* spp. จัดเป็นกลุ่มเชื้อราชนิดราสาย ที่มีรายงานผู้ติดเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง และในประเทศกำลังพัฒนา¹⁰ ซึ่งสาเหตุการตายจากการติดเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* พบว่าเสียชีวิตจากโรคปอดที่มีการวินิจฉัยว่าเป็น Aspergillosis¹¹ เชื้อ *Aspergillus* spp. เป็นเชื้อราที่พบปะปนในสิ่งแวดล้อม และมีบทบาทสำคัญในการปรับสมดุลของคาร์บอนและไนโตรเจนให้กับพืชและดิน จึงทำให้พบเชื้อราชนิดนี้บ่อยในพืชที่มีเปลือกและในดิน ด้วย

คุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus* spp. ที่เป็นราสายที่มีความเปราะบาง และฟุ้งกระจายมาก ทำให้เชื้อราสามารถกระจายสปอร์ของราและโคนิเดียไปตามอากาศได้ดี โดยพบว่าขนาดของโคนิเดียของเชื้อรา *Aspergillus* spp. นี้ มีขนาดประมาณ 2-3 ไมครอน ซึ่งสามารถเข้าถึงถุงลมปอดได้เป็นอย่างดี นั่นจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่เชื้อ *Aspergillus* spp. มักก่อโรคที่บริเวณปอดได้ค่อนข้างมาก และถูกจัดเป็นหนึ่งในจุลชีพชนิด air borne pathogens¹² ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ *Aspergillus* spp. หลายชนิดเริ่มมีการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น ทั้งยาในกลุ่ม azole, amphotericin B ตลอดจนยาในกลุ่ม echinocandin¹³⁻¹⁵ ทำให้การรักษาผู้ติดเชื้อทำได้ยากมากยิ่งขึ้น และยังคงต้องใช้งบประมาณในการรักษาค่อนข้างสูง สำหรับประเทศไทยพบรายงานการดื้อยาและมีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อ *Aspergillus* spp. เพิ่มมากขึ้นทุกปี¹⁶⁻¹⁷

สารในกลุ่ม fungal quorum sensing molecules เริ่มต้นพบครั้งแรกในกลุ่มของแบคทีเรีย โดยพบว่ามียาที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความหนาแน่นของจุลชีพ และจัดเป็นสารสื่อที่สำคัญระหว่างเซลล์ (density-dependent cell-cell signaling)¹⁸ โดยสารในกลุ่ม quorum sensing molecules มีบทบาทที่ส่งผลให้เชื้อมีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นและลดอัตราการถูกทำลายจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน¹⁹⁻²⁰ อีกทั้งยังมีผลทำให้เชื้อจุลชีพปรับเปลี่ยนศักยภาพของตัวเอง (autoinducers) ให้คงทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และเป็นอันตรายชนิดต่างๆ ได้เป็นอย่างดี¹⁸⁻²¹

สำหรับ fungal quorum sensing molecules นั้นเริ่มพบครั้งแรกในปี 1960 โดยพบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับที่พบในแบคทีเรีย²⁰⁻²² แต่ที่มีความแตกต่างที่ชัดเจนคือ fungal quorum sensing molecules นั้นสามารถกระตุ้นการสร้าง biofilm เพื่อปกป้องเชื้อราต่อสิ่งรบกวนภายนอก อีกทั้งยังมีผลต่อการปรับเปลี่ยนสัณฐานของเชื้อ (fungal dimorphism) ที่พบความสัมพันธ์ได้บ่อยคือ การเปลี่ยนลักษณะของยีสต์เป็นราสาย (yeast-mycelium dimorphism)

ส่งผลให้สามารถหลบหลีกหนีเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (Immune evasion) ตลอดจนยาต้านเชื้อราบางชนิดได้เป็นอย่างดี²³⁻²⁴ นอกจากนี้ยังพบว่า fungal quorum sensing molecules ยังเพิ่มศักยภาพของเชื้อราให้ทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ เช่น อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง pH ปริมาณ glucose ที่สูงหรือต่ำเกินไป ปริมาณไนโตรเจนที่เปลี่ยนแปลง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ ตลอดจนโลหะหนักบางชนิดหรือ chelating agents ที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อรา ส่งผลให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะเครียด และมีความสามารถในการติดเชื้อ (infectivity) ได้ดีแม้ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตนั่นเอง²¹⁻²⁴

ในปัจจุบันพบว่า fungal quorum sensing molecules นั้นมีมากมายหลายชนิด แต่เมื่อจัดเป็นกลุ่มๆ พบว่าแบ่งแยกออกได้เป็น farnesoic acid, α -(1,3)-glucan, pheromones, farnesol, tyrosol, phenylethanol และ tryptophol^{20,25} โดยการศึกษาคุณสมบัติของ fungal quorum sensing molecules ทั้ง 7 ชนิดนั้น มีการศึกษาในเชื้อราหลายชนิด แต่การศึกษาศักยภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในกลุ่มดื้อยา azole กับสาร fungal quorum sensing molecules ชนิด tryptophol นั้นยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ชัดเจน

Tryptophol เป็น fungal quorum sensing molecules ที่ได้จากการสลายกรดอะมิโนชนิด L-tryptophan (Trp) และเติมกลุ่มแอลกอฮอล์ในโมเลกุลของ tryptophan²⁶⁻²⁷ สำหรับคุณสมบัติของ Tryptophol (TrpOH) ที่มีบทบาทต่อการเจริญของเชื้อรานั้นมีการศึกษาในเชื้อราหลายชนิดทั้งที่เป็นกลุ่มที่ก่อโรคในคนและไม่ก่อโรคในคน

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของสาร fungal quorum sensing molecules ชนิด tryptophol ที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งชนิดราสายและยีสต์ โดยการศึกษาวิจัยนี้จะเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการการวิทยาเพื่อพิจารณาศักยภาพของสาร tryptophol ในการควบคุมการ

เจริญของเชื้อราชนิดยีสต์คือ *C. albicans* และชนิดราสาย คือ *A. fumigatus* ทั้งชนิดที่ตอบสนองต่อยาต้านเชื้อราชนิด azole และชนิดที่ดื้อยาต้านเชื้อราชนิด azole ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปสู่การศึกษาในสัตว์ทดลองและการนำไปพัฒนาเพื่อร่วมหรือใช้ในการรักษาเชื้อราชนิด *C. albicans* และ *A. fumigatus* ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร quorum sensing molecules ชนิด tryptophol ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยากลุ่ม azole

2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสาร quorum sensing molecules ชนิด tryptophol ในความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole ในเซลล์ไฟโบรเบลลัสต์

วิธีการศึกษา

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสาร quorum sensing molecules ชนิด tryptophol ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole

1.1 การเตรียมเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole ในห้องปฏิบัติการเพาะเชื้อ *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole ในอาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud dextrose agar (SDA) บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อราที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 2 วัน สำหรับเชื้อ *C. albicans* และบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน สำหรับเชื้อ *A. fumigatus* เมื่อครบระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ดำเนินการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อด้วยวิธี morphology identification โดยการดู

ลักษณะของโคโลนีและลักษณะของโคนิเดีย โครงสร้างของสายรกายใต้กล้องจุลทรรศน์ (macroscopic and microscopic identification)³⁷

1.2 การทดสอบการตอบสนองต่อยาต้านเชื้อรา กลุ่ม azole ในหลอดทดลองของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole

การทดสอบความไวของเชื้อ *C. albicans* และ *A. fumigatus* ต่อยาต้านเชื้อราชนิด voriconazole ด้วยวิธี micro broth dilution technique ใน 96 well plate ด้วยวิธีมาตรฐานของ CLSI M38-A2 document³³⁻³⁴ โดยทำการอ่านผลหลังจากบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *A. fumigatus* และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* เป็นค่า minimum inhibitory concentrations (MICs) ต่อยา

1.3 ศึกษา antifungal susceptibility testing ของ tryptophol ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole

การทดสอบความไวของเชื้อ *C. albicans* และ *A. fumigatus* ต่อ tryptophol ด้วยวิธี micro broth dilution technique ใน 96 well plate ด้วยวิธีมาตรฐานของ CLSI M38-A2³³⁻³⁴ documents โดยทำการอ่านผลหลังจากบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *A. fumigatus* และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *C. albicans* เป็นค่า minimum inhibitory concentrations (MICs) ต่อยา

2. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสาร quorum sensing molecules ชนิด tryptophol ในความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole ในเซลล์ไฟโบรเบลลัสต์

2.1 การศึกษาผลกระทบของ tryptophol ที่ความเข้มข้น minimum inhibitory concentrations

(MICs) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole กับความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ศึกษาผล cytotoxicity ของ tryptophol ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โดยประยุกต์จากการศึกษาของ Baygar T. และคณะ³⁵ โดยอาศัยเทคนิค MTT Assay

2.2 การศึกษาผลกระทบของ tryptophol ที่ความเข้มข้น minimum inhibitory concentration (MIC) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole กับเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ ตรวจสอบคุณสมบัติของ tryptophol ที่ความเข้มข้นที่ 2-64 mM ต่อการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โดยประยุกต์จากการศึกษาของ Sibiya

MA. และคณะ³⁶ ด้วยวิธี ethidium bromide-acridine orange staining assay และยืนยันการเปลี่ยนแปลงด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ โดยการตรวจสอบการแสดงออกของ caspase-8 และ CARD-9 gene ด้วยวิธี Conventional RT-PCR assay

ผลการศึกษา

1. ผลจากการทดสอบความไวต่อยาด้านเชื้อรา

จากการทดสอบความไวของเชื้อราและยีสต์ *C. albicans* และ *A. fumigatus* ต่อยาด้านเชื้อรา ด้วยวิธี micro broth dilution technique ใน 96 well plate ด้วยวิธีมาตรฐานของ CLSI M38-A2 document โดยผลของสาร tryptophol และยา voriconazole แต่ละช่วงของความเข้มข้น จากการอ่านผลการทดลองทำให้ได้ค่า MIC ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความไวต่อสาร tryptophol และยาด้านเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus*

Fungal	Minimum inhibitory concentration (MIC)	
	Tryptophol (mM)	Voriconazole (µg/ml)
<i>A. fumigatus</i> 293	8	2
<i>A. fumigatus</i> K07-cl 262	8	1
<i>A. fumigatus</i> BUU AF : env-001	8	1
<i>A. fumigatus</i> k02-env004	8	8
<i>C. albicans</i> 90028	2	1
<i>C. albicans</i> 5314	2	32
<i>C. albicans</i> 96901	2	4

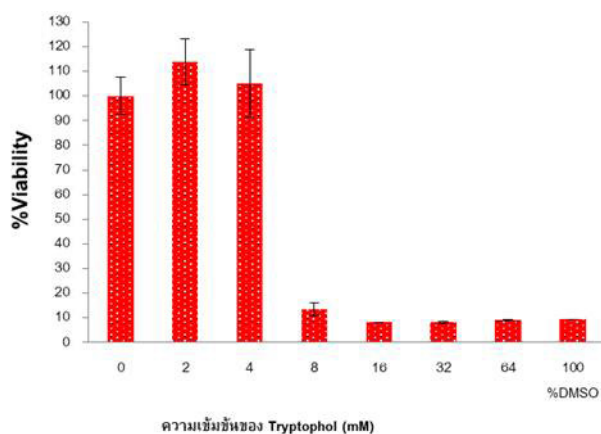
2. ผลจากการศึกษาผลของ tryptophol

ที่ความเข้มข้นที่ 0-64 mM ที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม

azole กับความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ โดยประยุกต์จากการศึกษาของ Baygar T. และคณะ³⁵ โดยอาศัยเทคนิค MTT Assay ได้ผลดังแสดงในภาพและแผนภูมิดังนี้

ตารางที่ 2 ร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ MTT

Tryptophol (mM)	%Viability	± SD
0	100.00	± 7.52
2	113.86	± 9.34
4	105.08	± 13.66
8	13.52	± 2.43
16	8.12	± 0.05
32	8.26	± 0.39
64	9.26	± 0.21



แผนภูมิที่ 1 ร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (%Viability)

3. ผลจากการศึกษาผลกระทบของ tryptophol ที่ 0-64 mM ที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยากลุ่ม

azole กับเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ด้วยวิธี ethidium bromide-acridine orange staining assay ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 3 ร้อยละของการเกิด Apoptotic ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์

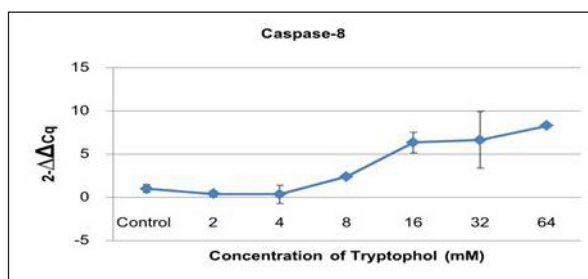
Condition	% live cells	% apoptotic cells
(Negative Control)	68	32
Tryptophol 2 mM	54	46
Tryptophol 4 mM	59.8	40.2
Tryptophol 8 mM	-	100
Tryptophol 16 mM	-	100
Tryptophol 32 mM	-	100
Tryptophol 64 mM	-	100
3.2% Ethanol	71	28
(Positive control)	-	100

4. ผลการยืนยันการเปลี่ยนแปลงด้วยเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล โดยการตรวจสอบการแสดงออกของ caspase-8 และ CARD-9 gene ด้วยวิธี quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

คำนวณเพื่อหาค่า relative ratio โดยนำมาเข้าสู่สูตร $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ในแต่ละยีน ซึ่งจะได้ค่า relative ratio เป็นจำนวนเท่าของการแสดงออกที่ control ดังแสดงตามตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 4 ค่า relative ratio ของแต่ละยีนในแต่ละความเข้มข้นของ tryptophol

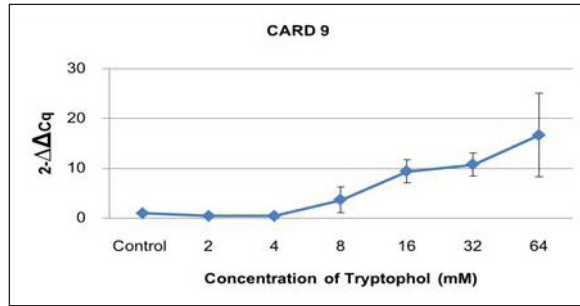
Concentration of Tryptophol (mM)	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	
	Caspase-8	CARD 9
Control	1.00 ± 0	1.00 ± 0
2	0.4058 ± 0.46	0.4513 ± 0.42
4	0.3682 ± 0.35	0.4274 ± 0.39
8	2.4207 ± 1.06	3.6363 ± 2.58
16	6.3426 ± 0.09	9.3677 ± 2.28
32	6.6230 ± 1.22	10.7561 ± 2.26
64	8.3044 ± 3.28	16.6601 ± 8.37



แผนภูมิที่ 2 การแสดงออกของยีน Caspase-8 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วย tryptophol ที่ความเข้มข้น 2-64 mM

การแสดงออกของยีน caspase-8 เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกกระตุ้นด้วย tryptophol ที่ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 2 และ 4 mM พบว่าการแสดงออกของยีน caspase-8 ลดลงที่ 0.4058 ± 0.46 และ 0.3682 ± 0.35 เท่า

ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8, 16, 32 และ 64 mM พบว่าการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นที่ 2.4207 ± 1.06 , 6.3426 ± 0.09 , 6.6230 ± 1.22 และ 8.3044 ± 3.28 เท่า ตามลำดับ



แผนภูมิที่ 3 การแสดงออกของยีน CARD-9 ในชั่วโมงที่ 24 เมื่อกระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วย tryptophol ที่ความเข้มข้น 2-64 mM

การแสดงออกของยีน CARD-9 เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ถูกกระตุ้นด้วย tryptophol ที่ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 2 และ 4 mM พบว่าการแสดงออกของยีน CARD 9 ลดลงที่ 0.4513 ± 0.42 และ 0.4274 ± 0.39 เท่าตามลำดับ และที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8, 16, 32 และ 64 mM พบว่าการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นที่ 3.6363 ± 2.58 , 9.3677 ± 2.28 , 10.7561 ± 2.26 และ 16.6601 ± 8.37 เท่าตามลำดับ

อภิปรายผล

จากการทดลองพบว่าค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุด (MIC) ของ tryptophol ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. fumigatus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ มีค่าอยู่ที่ 8 mM สำหรับ *C. albicans* มีค่า MIC อยู่ที่ 2 mM

เมื่อนำความเข้มข้นของ tryptophol ที่ความเข้มข้น 2-64 mM มาทดสอบความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยอาศัยเทคนิค MTT Assay พบว่า ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 mM ไม่เป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ มีร้อยละของการมีชีวิตอยู่ที่ 113.86 ± 9.34 และ 105.08 ± 13.66 ตามลำดับ ซึ่งที่ความเข้มข้นที่ 2 mM เป็นค่า MIC ของเชื้อ *Candida albicans* 90028, 5314, 96901 การที่ค่าร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์มีค่ามากกว่า 100 อาจมีสาเหตุมาจากการถูกกระตุ้นด้วยสาร

tryptophol ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไปเพิ่มกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ทำให้ได้ค่าร้อยละสูงกว่า 100 ส่วนที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8-64 mM เป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8 mM เป็นค่า MIC ของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* 293, *A. fumigatus* K07-cl 262, *A. fumigatus* BUU AF : env-001, *A. fumigatus* k02-env004 นำความเข้มข้นของ tryptophol ที่ความเข้มข้น 2-64 mM มาทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ด้วยวิธี ethidium bromide-acridine orange staining assay พบว่า ที่ 2 และ 4 mM มีการเกิด apoptosis อยู่ที่ 46 และ 40.2% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 8-64 mM มีการเกิด apoptosis อยู่ที่ 100%

จากการศึกษาของ Wongsuk T และคณะ (2019)³⁸ ได้ทำการทดลองหาร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ A549 จากการนำ tryptophol มาทดสอบกับเซลล์ A549 ที่ความเข้มข้น 0.25-16 mM โดยทำการบ่มที่ 12 ถึง 48 ชั่วโมง พบว่า ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ A549 ต่ำกว่า 80 ที่ความเข้มข้นของ tryptophol 4-16 mM (12 ชั่วโมง) 2-16 mM (24 ชั่วโมง) และ 0.5-16 mM (48 ชั่วโมง)

จากการศึกษาของ Liu K และคณะ (2015)³⁹ ได้ศึกษาการเกิด apoptosis ของเซลล์ human osteosarcoma line (OS-732 cell) กับ kappa-

selenocarrageenan ที่ความเข้มข้น 30, 60 และ 120 µg/ml และนำไปย้อมด้วย fluorescent staining solution ที่ประกอบไปด้วย 100 µg/ml AO and 100 µg/ml EB และดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้อง fluorescent microscope พบว่า normal cells จะเห็นนิวเคลียสเป็นทรงกลมกระจายอยู่ตรงกลางเซลล์ early-stage apoptotic cells เซลล์จะมีรูปร่าง crescent-shaped หรือ granular จะมีนิวเคลียสสีเหลือง-เขียว ของสีย้อม AO staining เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารและระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น จำนวนการเกิด early-stage apoptotic cells จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ยังตรวจพบเซลล์ late-stage apoptotic cells ที่มีการย้อมติดสี EB staining นิวเคลียสจะมีสีส้มที่เข้มและไม่สมมาตร ส่วนการเกิด Necrotic cells มีปริมาณเซลล์ที่จะสลายเพิ่มขึ้น และมีการเรืองแสงสีแดงส้มที่ไม่สม่ำเสมอที่รอบนอก แสดงให้เห็นถึงเซลล์อยู่ในกระบวนการสลายตัว

จากการศึกษางานวิจัยของ Wongsuk T และคณะ (2019)³⁸ พบว่าความเข้มข้นของ tryptophol ต่อร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ไม่เท่ากัน อาจเนื่องจากศึกษาในเซลล์ที่แตกต่างกัน เซลล์ A549 เป็นเซลล์ epithelial จากปอด ส่วน Human fibroblast เป็นเซลล์ผิวหนัง และจากการศึกษาของ Liu K และคณะ (2015)³⁹ จะช่วยเป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการดูเซลล์ apoptosis

ผลของการทดลองความสัมพันธ์ของแต่ละยีนในแต่ละความเข้มข้นของ tryptophol (relative ratio) ที่นำมากระตุ้นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ที่ความเข้มข้น 2-64 mM พบว่า ที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 2 และ 4 mM มีการแสดงออกของยีน caspase-8 และ CARD-9 ลดลง และที่ความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8, 16, 32 และ 64 mM มีการแสดงออกของยีน caspase-8 และ CARD-9 เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาการกระตุ้นของ tryptophol ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8 mM เซลล์เกิดกระบวนการ apoptosis

สรุปผล

จากการศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม Azole พบว่าค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) ได้ อยู่ที่ 2 และ 8 mM ตามลำดับ และเมื่อนำความเข้มข้นดังกล่าวมาทดสอบความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยการทำให้ MTT พบว่าความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 2 และ 4 mM ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และเริ่มเป็นพิษต่อเซลล์ที่ความเข้มข้น 8 mM และจากการทดสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ด้วยวิธี ethidium bromide-acridine orange staining assay พบว่าความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8-64 mM มีการเกิด apoptosis อยู่ที่ 100% และทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน caspase-8 และ CARD-9 ด้วยวิธี quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) พบว่ามีการแสดงออกของทุกยีนเพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 8 mM ซึ่งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ด้วยกระบวนการ apoptosis โดยศึกษาที่ยีน caspase-8 และ CARD-9

จากผลที่ได้พบว่าความเข้มข้นของ tryptophol ที่ 8 mM เป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งเชื้อรา *C. albicans* และ *A. fumigatus* ชนิดที่ตอบสนองและชนิดดื้อยา กลุ่ม azole แต่ยังมีข้อจำกัดของ tryptophol ที่มีผลต่อการเกิด apoptosis ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ทำให้ต้องมีการพัฒนาและศึกษาต่อยอดเพื่อให้ได้ซึ่งผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยจะต้องนำมาศึกษาต่อในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) ชนิด *C. elegans* และสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) โดยใช้หนูทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Sahni K, Singh S, Dogra S. Newer topical treatments in skin and nail dermatophyte infections. *Indian J Dermatol* 2018;9:149-58.
2. Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* 2018;360:739-42.
3. Lam JM. Opportunistic fungal infection in children and management. *Curr Opin Pediatr* 2018;30:514-9.
4. Oltolini C, Ripa M, Andolina A, et al. Invasive pulmonary Aspergillosis complicated by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection during pembrolizumab immunotherapy for metastatic lung adenocarcinoma: Case report and review of the literature. *Mycopathologia* 2019;184:181-5.
5. Walsh TJ, Katragkou A, Chen T, et al. Invasive candidiasis in infants and children: Recent advances in epidemiology, diagnosis, and treatment. *J Fungi (Basel)* 2019;5:1-9.
6. Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int* 2013;2013:1-13.
7. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms and treatment. *J Infect Dis* 2017;216:S445-51.
8. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Front Microbiol* 2017;7:1-12.
9. Gao J, Wang H, Li Z, et al. *Candida albicans* gains azole resistance by altering sphingolipid composition. *Nat Commun* 2018;9:1-15.
10. Latge JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* 2001;9:382-9.
11. Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juwadi PR, et al. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:1-18.
12. Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:310-50.
13. Blum G, Hortnagl C, Jukic E, et al. New insight into amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Ch* 2013;57:1583-8.
14. Kemoi EK, Nyerere A, Bii CC. Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* from Fungicide-experienced soils in Naivasha subcounty and Nairobi county, Kenya. *Int J Microbiol* 2018;2018:1-6.
15. Berger S, El Chazli Y, Babu AF, et al. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: A consequence of antifungal use in agriculture?. *Front microbiol* 2017;8:1-7.
16. Tangwattanachuleeporn M, Minarin N, Saichan S, et al. Prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of Thailand. *Medical Mycology* 2017;55:429-35.

17. Walker TA, Lockhart SR, Beekmann SE, et al. Recognition of azole-resistant Aspergillosis by physicians specializing in infectious diseases, United States. *Emerg Infect Dis* 2018;24:111-3.
18. Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. *MBio* 2018;9:1-13.
19. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi a review. *Med Mycol* 2012;50:337-45.
20. Padder SA, Prasad R, Shah AH. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiol Res* 2018;210:51-8.
21. Barriuso J. Quorum sensing mechanisms in fungi. *Aims Microbiol* 2015;1:37-47.
22. Hogan DA. Talking to themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell* 2006;5:613-9.
23. Hornby JM, Jacobitz-Kizzier SM, McNeel DJ, et al. Inoculum size effect in dimorphic fungi: Extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratomyces ulmi*. *Appl Environ Microb* 2004;70:1356-9.
24. Nadal M, Garcia-Pedrajas MD, Gold SE. Dimorphism in fungal plant pathogens. *Fems Microbiol Lett* 2008;284:127-34.
25. Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol* 2016;56:440-7.
26. Rosazza JP, Juhl R, Davis P. Tryptophol formation by *Zygosaccharomyces priorianus*. *Appl Microbiol* 1973;26:98-105.
27. Valera MJ, Morcillo-Parra MA, Zagorska I, et al. Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. *Int J Food Microbiol* 2019;289:174-81.
28. Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* 2006;20:1150-61.
29. De Sordi L, Muhlschlegel FA. Quorum sensing and fungal-bacterial interactions in *Candida albicans*: A communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS Yeast Res* 2009;9:990-9.
30. Gori K, Knudsen PB, Nielsen KF, et al. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* 2011;11:643-52.
31. Verbrugghe E, Adriaensen C, Martel A, et al. Growth regulation in Amphibian pathogenic chytrid fungi by the quorum sensing metabolite Tryptophol. *Front Microbiol* 2019;9:1-12.
32. Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Gene Dev* 2006;20:1150-61.
33. Tamura T, Asahara M, Yamamoto M, et al. In vitro susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. *Microbiol Immunol* 2014;58:1-8.

34. Adimi P, Hashemi SJ, Mahmoudi M, et al. In-vitro Activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophytes strains using microdilution method in Tehran. Iran J Pharm Res 2013;12:537-45.
35. Baygar T, Sarac N, Ugur A, et al. Antimicrobial characteristics and biocompatibility of the surgical sutures coated with biosynthesized silver nanoparticles. Bioorg Chem 2018;86: 254-8.
36. Sibiya MA, Raphoko L, Mangokoana D, et al. Induction of cell death in human A549 cells using 3-(Quinoxaline-3-yl) prop-2-ynyl methanosulphonate and 3-(Quinoxaline-3-yl) prop-2-yn-1-ol. Molecules 2019;24:1-16.
37. Sutabhaha B. Laboratory identification of pathogenic fungi. 3rd ed. Chiang Mai: Darawan printing ltd; 2009.
38. Wongsuk T, Sukphopetch P. Effect of quorum sensing molecules on *Aspergillus fumigatus*. Walailak J Sci & Tech 2020;17: 348-58.
39. Liu K, Liu P C, Liu R, et al. Dual AO/EB staining to detect apoptosis in Osteosarcoma cells compared with flow cytometry. Med Sci Monit Basic Res 2015;21:15-20.