

การศึกษาบทบาทของสารคอร์รัมเซนซิงเชิงโมเลกุลชนิดทริปโตฟอล ต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรคแบบรุกราน

พิชญา สวรรคต¹ วัชรมาศ ม่วงแก้ว² ธัญญรัตน์ เพียรมา¹ พรพรรณ ขำเอี่ยม² ณิชา เรือนมูล³ ผลา จำปาน³

วันเพ็ญ พันธุ์บุตร³ วลลภา หล่อเหลี่ยม¹ ธิดินันท์ กิตสิน² ภัสเนศวร์ สุขโพธิ์เพชร²

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²ภาควิชาจุลชีววิทยาและอิมมูโนโลยี คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

³คลินิกผิวหนัง ฝ่ายการพยาบาล โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน

Received: May 20, 2023

Revised: June 14, 2023

Accepted: July 20, 2023

บทคัดย่อ

โรคติดเชื้อราเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก ซึ่งส่งผลกระทบต่อมนุษย์เนื่องจากมีความถี่ในการติดเชื้อราเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง การติดเชื้อราแบบรุกรานสามารถรักษาได้ยากเนื่องจากเป็นอันตรายถึงชีวิต วินิจฉัยยาก มีแนวทางการรักษาที่จำกัด เนื่องจากเชื้อราถูกจัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต ซึ่งมีลักษณะคล้ายเซลล์คน จึงอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยค่อนข้างสูง เช่น ยากลุ่มโพลีอิน ยากลุ่มเอโซล และยากลุ่มเอไคโนแคนดิน สารคอร์รัมเซนซิงเชิงโมเลกุล ชนิดทริปโตฟอล เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตได้จากยีสต์ โดยมีการค้นพบว่ามันผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรค งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของทริปโตฟอลต่อการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคแบบรุกราน (systemic mycosis) โดยศึกษาการยับยั้งของเชื้อรา *Histoplasma capsulatum*, *Talaromyces marneffeii*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis* และ *Lodderomyces elongisporus* พบว่ามีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อรา (MIC) ได้อยู่ที่ 6.25, 3.12, 25, 3.12, 12.5 และ 12.5 mM และมีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (MFC) ได้อยู่ที่ 50, 3.12, 50, 6.25, 25 และ 25 mM ตามลำดับ นำความเข้มข้นของทริปโตฟอลที่ 3.12 และ 31.2 mM (10 เท่าของค่า MIC) มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งเรื้อรังปอดชนิด A549 โดยการย้อม Trypan blue พบว่าเซลล์ A549 มีร้อยละของการรอดชีวิตของเซลล์อยู่ที่ 98.94 และ 1.09 ตามลำดับ ทำการทดสอบความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์ A549 โดยอาศัยเทคนิค MTT assay พบว่า มีร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 66.31±2.91 และ 6.30±0.28 ตามลำดับ จากการทดสอบผลของสารทริปโตฟอลต่อการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสโดยการย้อมเซลล์ด้วย acridine orange-ethidium bromide (AO/EB) ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนส์ พบว่า มีร้อยละการตายแบบอะพอพโทซิสเท่ากับ 11 และ 93 ตามลำดับ

คำสำคัญ: เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549; ความเป็นพิษต่อเซลล์; สารคอร์รัมเซนซิงเชิงโมเลกุล; ทริปโตฟอล

ผู้สนับสนุนผลงาน:

ภัสเนศวร์ สุขโพธิ์เพชร

คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล

420/6 ถนนราชวิถี แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

อีเมล: natthanej.lup@mahidol.ac.th

The potential role of fungal Quorum-sensing, Tryptophol, in human pathogenic fungi focusing on systemic mycosis

Phichaya Sawunkatut¹, Watcharamat Muangkaew², Tanyarat Pianmak¹, Pronpan Khum-eam², Nitcha Ruenmul³, Phala Jampan³, Wanpen Panbu³, Wanlapa Lorliam¹, Thitinan Kitisin², Passanesh Sukphopetch²

¹Department of Microbiology, Faculty of Science, Srinakarinwirot University

²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

³Dermatological Unit, Nursing Department, Hospital for Tropical Diseases, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University

Abstract

Tryptophol, a quorum-sensing molecule (QSM), is a secondary metabolite secreted from yeast. Recent studies have suggested anti-fungal activity against pathogenic fungi. This study aims to determine the activity of tryptophol against the growth of invasive pathogenic fungi, including *Histoplasma capsulatum*, *Talaromyces marneffe*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis*, and *Lodderomyces elongisporus* and to study the cytotoxicity on A549 lung cancer cells. The lowest MIC and MFC values of *H. capsulatum*, *T. marneffe*, *A. fumigatus*, *C. neoformans*, *C. parapsilosis*, and *L. elongisporus* were MIC 6.25, 3.12, 25, 3.12, 12.5, and 12.5 mM and MFC 50, 3.12, 50, 6.25, 25, and 25 mM, respectively. The cytotoxic effect of tryptophol on A549 cells at the concentration of 3.12 and 31.2 mM for 24 h were determined. Cell viability was 98.94% and decreased to 1.09% after treated with a higher concentration of tryptophol, as determined by using trypan blue staining. Percentage of cell cytotoxicity was 66.31 ± 2.91 and $6.30 \pm 0.28\%$ in 3.21 mM and 31.2 mM (10 folds of MIC) of Tryptophol, respectively, which determined using MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The induction of cell apoptosis by tryptophol, was determined using acridine orange-ethidium bromide (AO/EB) staining and examined under fluorescence microscope. The results showed that tryptophol exhibited anti-fungal properties, although it induced A549 cell cytotoxicity and apoptosis by 11% and 93%, respectively.

Keywords: A549 cells; cell toxicity; Quorum-sensing molecules; Tryptophol

Corresponding Author:

Passanesh Sukphopetch

Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University
420/6 Ratchawithi Road, Thung Phaya Thai, Ratchathewi, Bangkok 10400, Thailand.

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

บทนำ

โรคติดเชื้อราเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญทั่วโลก ซึ่งส่งผลกระทบต่อมนุษย์ เนื่องจากมีความถี่ในการติดเชื้อรามากขึ้นโดยเฉพาะผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง^{1,2} แม้ว่าจะมีการติดเชื้อราบริเวณผิวหนังชั้นนอกถึง 25% ของประชากรทั้งหมด³ แต่การติดเชื้อราแบบรุกรานนั้นสามารถรักษาได้ยากกว่าเนื่องจากเป็นอันตรายถึงชีวิต วินิจฉัยยาก มีแนวทางการรักษาที่จำกัด^{4,5} ยารักษาส่วนมากมีราคาแพงและอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่รุนแรงได้ โดยพบว่ามีผู้เสียชีวิตจากการติดเชื้อราแบบรุกรานประมาณ 1.5 ล้านคนต่อปี⁴ ปัจจุบันการพัฒนารักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรายังมีไม่มากพอเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่นเนื่องจากราถูกจัดอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งมีลักษณะคล้ายเซลล์คน จึงอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยค่อนข้างสูง โดยยารักษาที่นิยมใช้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ยาต้านเชื้อราที่ใช้ภายนอก (topical antifungal drugs) เป็นยาทาภายนอกหรือเหน็บสำหรับรักษาโรคติดเชื้อราที่ผิวหนังชั้นตื้นๆ หรือผิวหนังชั้นนอก เช่น การรักษาโรคกลาก เกื้อื้อ และยาต้านเชื้อราที่มีผลทั่วร่างกาย (systemic antifungal drug) เป็นยาใช้ภายในด้วยการรับประทานหรือฉีด ซึ่งใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อราที่อวัยวะภายในและกระแสเลือด เช่น ยากลุ่มโพลีอิน (Polyenes) และยากลุ่มเอโซล (Azoles) และยากลุ่มเอไคโนแคนดิน (Echinocandins) ซึ่งมีกลไกที่เกี่ยวข้องกับผนังเซลล์และ ergosterol ที่บริเวณเยื่อหุ้มเมมเบรนของเชื้อราทำให้เกิดรูรั่ว และเกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์

Systemic mycoses เป็นโรคติดเชื้อราที่เกิดกับระบบอวัยวะภายในร่างกาย ก่อให้เกิดโรคได้ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันหรือเป็นโรคเรื้อรัง เชื้อราก่อโรคส่วนใหญ่มักเกิดจากเชื้อราสองรูป (dimorphic fungi) เป็นราก่อโรคได้แม้ในคนที่มียาต้านเชื้อราแข็งแรง จึงเรียกรากลุ่มนี้ว่า true pathogens ที่พบบ่อย ได้แก่ Histoplasmosis, Blastomycosis, Coccidioidomycosis, Paracoccidioidomycosis,

Penicilliosis marneffei เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า มีเชื้อฉวยโอกาสบางชนิด (opportunistic fungi) ที่สามารถก่อให้เกิดความผิดปกติเหมือนกับ systemic (deep) mycoses ได้ เช่น *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Zygomycetes* โดยการก่อโรคของเชื้อราในกลุ่มนี้ มักจะมีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ที่ลดน้อยลงจากสาเหตุต่างๆ ได้แก่ ปลูกถ่ายอวัยวะ รับประทานยาต้านภูมิคุ้มกัน รับประทานสเตียรอยด์ ชนิดกินเป็นเวลานาน ผู้ป่วยเบาหวาน รวมถึงผู้ติดเชื้อเอชไอวี เป็นต้น⁶

Candida spp. เป็นเชื้อประจำถิ่น เช่น *Candida albicans* พบบริเวณช่องปาก ผิวหนังทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ และระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น แต่สามารถเป็นเชื้อฉวยโอกาส ก่อให้เกิดโรคเมื่อภูมิคุ้มกันร่างกายต่ำกว่าปกติ ซึ่งเป็นการติดเชื้อบริเวณเยื่อตามร่างกาย เช่น เพดานปาก ลิ้น ช่องคลอด และรอบทวารหนัก นอกจากนั้นยังพบการติดเชื้อที่ผิวหนัง เล็บ และสามารถลุกลามไปยังอวัยวะภายในและระบบหมุนเวียนเลือด ก่อให้เกิดเยื่อหุ้มหัวใจและเยื่อสมองอักเสบ ปัจจุบันมีรายงานการติดเชื้อกลุ่ม non-*albicans Candida* spp. มากขึ้น เช่น *Candida parapsilosis* ก่อให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งบริเวณผิวหนังชั้นตื้น (superficial infection) และแบบแพร่กระจาย (systemic infection) ซึ่งเป็นสาเหตุถึง 8-15% ของการติดเชื้อในกระแสเลือด^{7,8}

Talaromyces marneffei จัดเป็นราสองรูปที่สามารถเจริญในรูปราสายที่สภาวะอุณหภูมิห้อง และสามารถเป็นรูปร่างเป็นยีสต์โดยแบ่งเซลล์แบบ fission ที่สภาวะอุณหภูมิร่างกายมนุษย์ และเป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาสในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง เช่น ผู้ป่วยเอดส์ โดยเฉพาะในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ฮองกง จีน และตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย ผู้ป่วยได้รับเชื้อผ่านทางหายใจ โดยเชื้ออาจปนเปื้อนในดินขึ้น⁹ การติดเชื้อสามารถแสดงอาการได้ 2 แบบ คือ แบบติดเชื้อเฉพาะที่ เช่น ผิวหนัง ต่อม้ำตาเหลือง กระดูกและข้อ และการติดเชื้อแบบแพร่กระจาย โดยเชื้อจะ

เข้าสู่ไขกระดูก¹⁰ การแสดงอาการของโรคในผู้ป่วย HIV และ immunodeficiency จะเป็นแบบ disseminated infection เริ่มจากมีอาการ subacute illness คือมีไข้ น้ำหนักลด ตับม้ามโต ต่อมน้ำเหลืองโต ระบบทางเดินหายใจและระบบทางเดินอาหารผิดปกติ รอยโรคที่พบบ่อยบริเวณผิวหนังเป็นแบบตุ่มแข็ง (papules) และต่อมามีเยื่อตายตรงกลาง และอีกลักษณะที่พบบ่อยคือฝีหนองที่อยู่ลึกลงไปชั้น subcutaneous tissue และอาจพบที่กระดูกหรือข้อ ทำให้เกิดการอักเสบ บวมแดง ร้อนที่ผิวหนังบริเวณกระดูกหรือข้อได้

โรค histoplasmosis หรือ Darling's disease มีสาเหตุจากราสองรูป *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* เป็นเชื้อราติดเชื้อในปอดที่พบบ่อยที่สุด ต่อมาจะกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ เชื้อราพบได้ในดิน ซากพืช ในมูลค้างคาวและนกบางชนิด เจริญได้ดีที่มีความชื้น และอุณหภูมิ 20°C ถึง 30°C โดยเชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเดินหายใจในรูปของสปอร์หรือโคนิเดีย และสามารถนำไปสู่โรคปอดบวมรุนแรง เยื่อปอดอักเสบหรือเรื้อรังคล้ายกับวัณโรค การแพร่กระจายของเชื้อมักไปยังอวัยวะภายใน เช่น ตับอ่อน ตับ ม้าม ลำไส้ และเยื่อหุ้มสมอง โดยอาการเริ่มแรกเป็นแผลริมแข็ง (chancre) ที่มีหนองน้ำเหลืองอักเสบ (lymphangitis) และต่อมน้ำเหลืองอักเสบ (lymphadenitis) ต่อมา มีแผลเหวี่ยงเป็นก้อนกลม (nodular gummatous lesions) เซลลูไลติส (cellulitis) แผลเปื่อย หรือแผลพุพอง (ulcers) ในผู้ป่วย HIV/AIDS มักเกิดรอยโรคที่ศีรษะและคอ รวมถึงผิวหนังทั้งหมด ฝ่ามือ ฝ่าเท้า ช่องปาก และทวารหนัก¹¹

Cryptococcosis เป็นโรคเรื้อรัง กิ่งเยื่อปอดอักเสบถึงเยื่อปอดอักเสบในปอด หรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ติดต่อกันได้โดยการสัมผัสสปอร์หรือสปอร์ของเชื้อเข้าไปสะสมในร่างกาย การติดเชื้อในปอดระยะแรกจะยังไม่พบอาการ แต่แสดงอาการในผู้ที่ภูมิคุ้มกันบกพร่องโดยมีอาการ 5 ลักษณะ คือที่ปอด (Pulmonary cryptococcosis) อาจมีอาการไอ มีไข้ต่ำ และเยื่อหุ้มปอดอักเสบ (pleuritic) ที่ระบบประสาท (CNS

cryptococcosis) คือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (Cryptococcal meningitis) และเกิดก้อนเชื้อราในสมอง (Cryptococcoma) ที่ผิวหนัง (Cutaneous cryptococcosis) เป็นตุ่มหนองบนผิวหนัง ต่อมาจะกลายเป็นฝีและแตกออกเป็นแผลหลุมที่กระดูก (Osseous cryptococcosis) เช่น ในกะโหลกศีรษะ และกระดูกสันหลัง รวมถึงอาการข้ออักเสบ และแบบแพร่กระจายทั่วร่างกาย ซึ่งจะเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้เกิดการอักเสบ เป็นฝีที่อวัยวะภายในทั่วร่างกาย มักมีสาเหตุจาก *Cryptococcus neoformans* และ *Cryptococcus gattii* และอาจพบได้จาก *Naganishia albida* และ *Patiliotrema laurentii*¹²

การใช้ยาต้านเชื้อราเป็นยารักษาและป้องกันอาการต่างๆ ที่เกิดจากเชื้อรา โดยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเชื้อรา (fungistatic) หรือมีฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (fungicidal) ปัจจุบันการพัฒนายารักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรายังมีไม่มากพอเมื่อเทียบกับยาปฏิชีวนะชนิดอื่น เนื่องจากรากฐานอยู่ในกลุ่มยูคาริโอต (eukaryote) ซึ่งมีลักษณะคล้ายเซลล์คน จึงอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยค่อนข้างสูง โดยยารักษาที่นิยมใช้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ยาต้านเชื้อราที่ใช้ภายนอก (topical antifungal drugs) เป็นยาทาภายนอกหรือเหน็บ สำหรับรักษาโรคติดเชื้อราที่ผิวหนังชั้นตื้นๆ หรือผิวหนังชั้นนอก และยาต้านเชื้อราที่มีผลทั่วร่างกาย (systemic antifungal drug) เป็นยาใช้ภายในด้วยการรับประทานหรือฉีด ซึ่งจะใช้ในขนาดที่ป้องกันการแบ่งตัวของเชื้อ (fungistatic) เท่านั้น เพราะอาจมีพิษต่อร่างกายคนเนื่องจากมีโครงสร้างของเซลล์คล้ายกับของเชื้อรา¹³⁻¹⁸

สารควอรัมเซนซิงเชิงโมเลกุล (Quorum sensing molecule) ในเชื้อราหลายชนิด มีบทบาทในการสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell-cell communication) และการเปลี่ยนรูปร่างระหว่างยีสต์กับราสายในกลุ่มราสองรูป โดยเป็นสารที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์ และจะมีมากขึ้นตามความหนาแน่นของประชากร โดยสามารถพบได้ในยีสต์ เช่น *Candida albicans*,

Debaryomyces hansenii, *Cryptococcus neoformans* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยได้มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาสารควอร์มเซนซิงเชิงโมเลกุลที่ผลิตได้จากยีสต์ *Candida albicans* พบว่ามีการหลั่งสารกลุ่มอะโรมาติกแอลกอฮอล์ ประกอบด้วย ไทโรซอล, ฟาร์นิซอล, ทริบิโตนอล และ ฟินิลเอทานอล¹⁹ โดยมีการค้นพบว่า farnesol และ tryptophol ที่สร้างได้จาก *Candida albicans* สามารถควบคุมการเกิดเส้นใยของเชื้อราก่อโรคแบบฉวยโอกาส ลดการเปลี่ยนไปมาของรูปร่างยีสต์และราสาย และสามารถลดการยึดเกาะกับผิว polystyrene ในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* และสารชนิดทริบิโตนอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* ได้ดีกว่าสารควอร์มเซนซิงชนิดอื่น²⁰ นอกจากนี้ยังสามารถลดการเจริญและการสร้างไบโอฟิล์มของ *Scedosporium apiospermum* เมื่อนำไปเคลือบบนพื้นผิวของ catheter²¹

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาสารควอร์มเซนซิงเชิงโมเลกุล ชนิดทริบิโตนอล ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคแบบรุกราน 6 ชนิด ประกอบด้วย *Histoplasma capsulatum*, *Talaromyces marneffeii*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida parapsilosis* และ *Lodderomyces elongisporus* ด้วยการหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อรา (MIC และ MFC) และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาแนวทางการรักษาโรคติดเชื้อราก่อโรคแบบรุกรานที่มีประสิทธิภาพขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาบทบาทของสารควอร์มเซนซิงเชิงโมเลกุล ชนิดทริบิโตนอล ต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรคแบบรุกราน
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารทริบิโตนอล ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาผลของทริบิโตนอลต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรคแบบรุกราน

1.1 การเตรียมเชื้อรา

เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบทั้ง 6 ชนิดบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับเชื้อราจะนำไปบ่มที่ 25°C 3-7 วัน และสำหรับยีสต์นำไปบ่มที่ 37°C 2-3 วัน จากนั้นจึงพิสูจน์ชนิดของเชื้อด้วยการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการดูลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะของสายราและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2 การทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (minimal inhibitory concentration: MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อรา (minimum fungicidal concentration: MFC)

ทดสอบความไวต่อยาต้านเชื้อราและสารทริบิโตนอล โดยวิธี micro broth dilution technique ใน 96 well plate ด้วยวิธีมาตรฐานของ CLSI M38-A2 document^{22,23} เพื่อหาค่า minimum inhibitory concentrations (MICs) โดยใช้สารทดสอบ 2 ชนิด คือสารทริบิโตนอล ความเข้มข้น 0.20-100 mM และ voriconazole 0.2-100 µg/ml โดยการเจือจางสารด้วยอาหาร RPMI 1640 และใช้เชื้อทดสอบที่ความเข้มข้น $0.5-5 \times 10^4$ เซลล์/หลุม นำไปบ่มที่ 37°C 2-3 วัน ทำการอ่านผล MICs โดยเทียบกับหลุมอาหาร RPMI 1640 และนำสารจากหลุมที่ใสมาหยดลงบนอาหาร PDA แล้วนำไปบ่ม สำหรับเชื้อราจะนำไปบ่มที่ 25°C 3-7 วัน และสำหรับยีสต์นำไปบ่มที่ 37°C 2-3 วัน เมื่อเชื้อเจริญจึงนำมาอ่านผลค่า MFC โดยให้หลุมที่ไม่มีการเจริญของโคโลนี เป็นหลุมที่มีค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อราได้

2. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสารทริบิโตนอล ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549

สารทดสอบที่ใช้ คือ ทริบิโตนอลที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC)

ที่นำมาทดสอบ โดยใช้ความเข้มข้นที่ 3.12 และ 31.2 mM (10 เท่าของค่า MIC), voriconazole 100 µg/ml โดยนำมาทดสอบการเป็นเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 โดยนำมาทดสอบดังต่อไปนี้

2.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์โดยการย้อมเซลล์เป็น เซลล์ตายด้วย Trypan blue

บ่มสารทริโบโตนอล และ Voriconazole ทดสอบร่วมกับเซลล์ A549 2×10^6 cell/flask ที่ 37°C, 5%CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายรูปลักษณะของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับแบบใช้แสง (invert light microscope) จากนั้นนำเซลล์มา trypsinization เพื่อย้อมดูเซลล์เป็น เซลล์ตาย โดยการย้อมด้วย trypan blue และนับเซลล์บน hemacytometer

2.2 ศึกษาการมีชีวิตจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

ศึกษาความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 โดยประยุกต์จากการศึกษาของ Baygar T. และคณะ²⁴ โดยอาศัยเทคนิค MTT assay ทำการบ่มสารทริโบโตนอลและ Voriconazole ทดสอบร่วมกับเซลล์ A549 5×10^4 cells/well (96-well plate) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml 10 µl/well แล้วนำไปบ่มที่ 37°C, 5%CO₂ 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปิเปตสารละลายในหลุมทิ้งแล้วเติม DMSO 150 µl/well นำไปเขย่า 15 นาทีบน plate shaker และดูดสารในหลุม 100 µl/well ย้ายไปใส่ใน 96-well plate อันใหม่ และนำไปวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย microplate reader แล้วนำไปวิเคราะห์ข้อมูลร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)

2.3 ศึกษาการมีชีวิตจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยการย้อมไมโทคอนเดรียด้วยวิธี Cyto painter mitogreen indicator reagent staining assay

บ่มสารทริโบโตนอลและ Voriconazole ทดสอบร่วมกับเซลล์ A549 5×10^5 cells/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (24-well plate) ที่ก้นหลุมมีการใส่แผ่น coverslip sterile ขนาด 10 มม. จากนั้นดูดอาหารเก่าออก ให้เหลือ 100 µl และเติมสาร Mitogreen indicator reagent 100 µl นำไปบ่มที่ 37°C, 5%CO₂ 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออก และล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ คีบแผ่น coverslip ลงบนแผ่นสไลด์แล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope)

2.4 ศึกษาการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วยวิธี Ethidium bromide- Acridine orange staining assay²⁵

บ่มสารทริโบโตนอลและ Voriconazole ทดสอบร่วมกับเซลล์ A549 2×10^6 cell/flask เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไป trypsinize cell แล้วนำตะกอนเซลล์ 20 µl ผสมกับสีย้อม AO/EB 2 µl ย้ายลงแผ่นสไลด์และปิดด้วย coverslip และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent microscope)

ผลการศึกษา

1. จากการศึกษาผลของทริโบโตนอลต่อการเจริญของเชื้อราก่อโรคแบบรุกราน

จากการทดสอบความไวของเชื้อราของสารทริโบโตนอลและ Voriconazole โดยวิธี micro broth dilution technique ใน 96 well plate ด้วยวิธีมาตรฐานของ CLSI M38-A2 document เพื่อหาค่า minimum inhibitory concentrations (MICs) จากการอ่านผลการทดลองทำให้ได้ค่า MIC ดังตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 Anti-fungal susceptibility tests of Tryptophol and Voriconazole against common invasive fungal pathogens in Thailand.

Common invasive fungal pathogen	Tryptophol (mM)		Voriconazole (µg/ml)	
	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>Aspergillus fumigatus</i>	25	50	<0.195	<0.195
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	12.5	25	<0.195	<0.195
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3.12	6.25	0.391	0.391
<i>Histoplasma capsulatum</i>	6.25	50	0.781	0.781
<i>Candida parapsilosis</i>	12.5	25	<0.195	12.5
<i>Taralomyces marneffe</i>	3.12	3.12	6.25	6.25

2. การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของสาร ทริปโตฟอล ต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549

2.1 ผลจากการศึกษาลักษณะของเซลล์ มะเร็งปอดชนิด A549 ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

กำลังขยาย 20X และผลการรอดชีวิตของเซลล์ โดยการย้อมเซลล์เป็น เซลล์ตายด้วย Trypan blue ที่บ่มร่วมกับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 1 (Figure 1) และตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 Percentage of A549 cell viability and dead cells after incubation with tryptophol or voriconazole for 24 hours

Tryptophol (mM)	%Viable cells	%Dead cells
3.12	98.94	1.06
31.2	1.09	98.91
Voriconazole 100 µg/ml	96.74	3.26

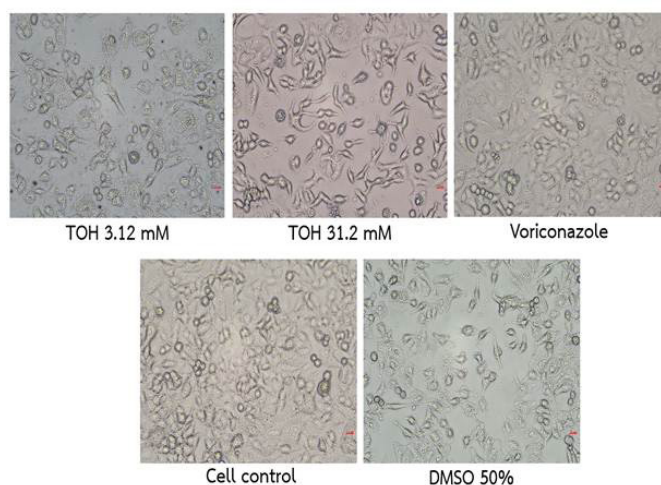


Figure 1 Cell morphology of A549 cells after incubation with Tryptophol or Voriconazole for 24 hours under a light microscope at 20x magnification.

2.2 ผลจากการศึกษาการมีชีวิตจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

จากการศึกษาผลของสารทริปโตฟอลและ Voriconazole ที่ความเข้มข้น 3.12 และ 31.2 mM, Voriconazole 100 µg/ml ที่ใช้ในการทดสอบ

การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา กับความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 โดยอาศัยเทคนิค MTT assay ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 (Figure 2)

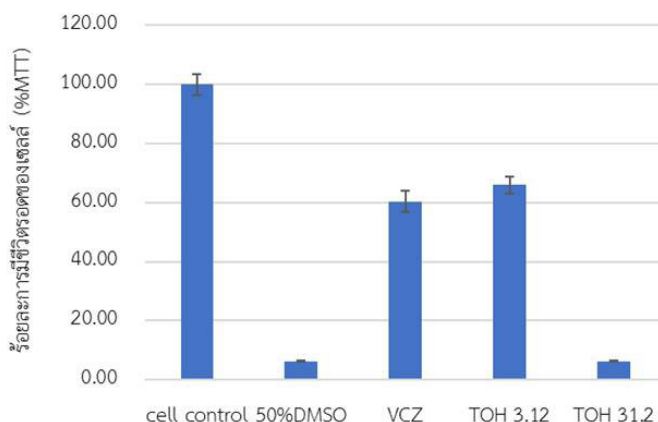


Figure 2 Percentage of A549 cell viability (%MTT) after incubation with Tryptophol or Voriconazole at various concentrations for 24 hours.

2.3 ผลการศึกษาลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 โดยการย้อมไมโทคอนเดรียด้วยวิธี Cyto painter mitogreen indicator reagent staining assay

จากการศึกษาผลของสารทริปโตฟอลและ Voriconazole ที่ความเข้มข้น 3.12 และ 31.2 mM, Voriconazole 100 µg/ml ที่ใช้ในการทดสอบการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา กับความเป็นพิษต่อ mitochondria ของเซลล์มะเร็งปอด ชนิด A549 ย้อมไมโทคอนเดรียด้วยวิธี Cyto painter mitogreen indicator reagent staining assay โดยไมโทคอนเดรียจะติดสีเขียวเรืองแสง เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3 (Figure 3)

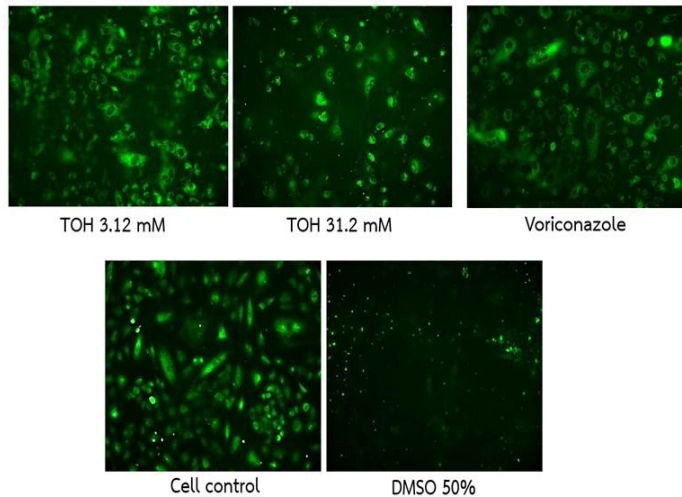


Figure 3 Cell morphology of A549 cells after incubation with Tryptophol or Voriconazole for 24 hours and stained with mitogreen.

2.4 ผลกระทบจากการศึกษาสารทริปโตฟอล และ Voriconazole ที่ความเข้มข้น 3.12 และ 31.2 mM, Voriconazole 100 µg/ml ที่ใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรากับการตายของ

เซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 แบบ apoptosis ด้วยวิธี Ethidium bromide-acridine orange staining assay ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 (Table 3)

Table 3 Percentage of A549 cell viability and apoptotic cells after incubation with Tryptophol or Voriconazole for 24 hours

Tryptophol (mM)	%Apoptotic cells
TOH 3.12 mM	11
TOH 31.2 mM	93
Voriconazole 100 µg/ml	16

อภิปรายผล

ผลการทดสอบการหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MFC)

การศึกษานี้พบว่าการใช้สารควอร์มิกซินเชิงโมเลกุล ชนิดทริปโตฟอล ต่อการเจริญของเชื้อราและยีสต์ก่อโรคแบบรุกราน จากการทดสอบค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (MIC) พบว่า การใช้

สารทริปโตฟอลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ต้องใช้ความเข้มข้นอย่างน้อย 3.12 - 12.5 mM และใช้ความเข้มข้น 3.25 - 50 mM จึงสามารถฆ่าเชื้อราก่อโรคแบบรุกรานทั้งหมดที่นำมาทดสอบ และเมื่อเปรียบเทียบกับ Voriconazole ความเข้มข้นเริ่มต้น 100 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในยาต้านเชื้อราในปัจจุบันพบว่า ใช้ความเข้มข้นเพียง 6.25 µg/ml ในการยับยั้งการเจริญ และที่ใช้ความเข้มข้น 12.5 µg/ml ในการฆ่าเชื้อราก่อโรคแบบรุกรานทั้งหมด สามารถสรุปได้

เบื้องต้นว่าทริบิโอฟอลสามารถใช้ยับยั้งเชื้อราได้ แต่ยังคงมีประสิทธิภาพน้อยกว่า Voriconazole ซึ่งเป็นยารักษาที่ใช้ทั่วไป จากผลการทดลองจึงเลือกความเข้มข้นของทริบิโอฟอลที่ 3.12 mM ซึ่งเป็นค่าต่ำที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และสิบเท่าของค่าน้อยที่สุดคือ 31.2 mM ในการนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

การศึกษาความเป็นพิษของทริบิโอฟอลต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549

ศึกษาลักษณะของเซลล์จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด A549 โดยการนำไปถ่ายภาพได้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าเซลล์ที่บ่มด้วยทริบิโอฟอลมีบางส่วนเซลล์เริ่มตายและพบมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร ในการทดสอบอื่นให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อย้อมเซลล์ด้วย Trypan blue แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์เป็นและเซลล์ตาย พบว่า เมื่อบ่มเซลล์ร่วมกับทริบิโอฟอล มีจำนวนเซลล์ที่รอดน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม และมีจำนวนเซลล์ตายมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร และเมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธี MTT assay พบว่าเซลล์ที่บ่มร่วมกับทริบิโอฟอลความเข้มข้น 3.12 mM มี %MTT เท่ากับ 66.01% และที่ความเข้มข้น 31.2 mM %MTT ลดลงถึง 6.30% ซึ่งใกล้เคียงกับ negative control (6.22%) และเมื่อนำเซลล์ไปศึกษาการตายแบบ apoptosis พบว่าทริบิโอฟอลความเข้มข้น 3.12% และ 31.2% ทำให้เกิดการตายของเซลล์ถึง 11% และ 93% และการย้อมด้วย Mitogreen พบว่าเมื่อใช้ทริบิโอฟอลความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลง และการเรืองแสงของไมโทคอนเดรียไม่กระจายทั่วเซลล์ทำให้เห็นรูปร่างเซลล์ไม่ชัดเจน

สรุปผล

จากผลการทดสอบจึงสรุปได้ว่าสารควอรัมเซนซิงซิงโมเลกุล ชนิดทริบิโอฟอล สามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแบบบูรณาการได้ โดย

มีค่า MIC อยู่ในช่วง 3.12 ถึง 12.5 mM และค่า MFC อยู่ในช่วง 3.12 ถึง 50 mM เมื่อนำไปทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด A549 พบว่า สามารถใช้ที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 3.12 mM แต่ไม่ควรใช้มากถึง 31.2 mM เนื่องจากจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ จากงานวิจัยเป็นการทดสอบสารทริบิโอฟอลในช่วงที่กว้าง ดังนั้น เพื่อพัฒนางานวิจัยควรศึกษาความเข้มข้นของทริบิโอฟอลที่มากที่สุดที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิด A549 หรือการศึกษาในกลุ่มเชื้อก่อโรคที่มีความจำเพาะมากขึ้นต่อการยับยั้งการเจริญและการฆ่าเชื้อโดยทริบิโอฟอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol Mol Biol Rev 2011;75:213-67.
2. Denning DW and Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. Trends Microbiol 2010;18:195-204.
3. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses 2008;51:2-15.
4. Brown GD, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections. Sci Transl Med 2012;4:165rv13.
5. Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections. Science 2012;336:647.
6. Pumirat P, Tunyong W, Luplertlop N. Medical mycology. J Med Health Sci 2013; 20:31-44.

7. Mutual selfcare. antifungals [Internet]. - [cited 2022 Apr 10]. Available from: <http://mutualselfcare.org/medicine/medicative/antimycotics.aspx?M=k&G=a>.
8. Wow skin science. Candidiasis Yeast Infection on Skin: How Is it Caused and How to Treat It? [Internet]. c2021 - [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://wowskinscience.com/blogs/news/candidiasis-yeast-infection-on-skin-how-is-it-caused-and-how-to-treat-it>.
9. The Lecturio Medical Concept Library. Azole. [Internet]. C2021 – [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://www.lecturio.com/concepts/azoles/>.
10. Borgers M. Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives. *Rev Infect Dis* 1980;2:520-34.
11. Padder SA, Prasad R, Shah AH. Quorum sensing: a less known mode of communication among fungi. *Microbiol Res* 2018;210:51-8.
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
13. Freydière AM, Guinet R. Rapid methods for identification of the most frequent clinical yeasts. *Rev Iberoam Micol* 1997;14: 85-9.
14. Garg A, Sharma GS, Goyal AK, et al. Recent advances in topical carriers of anti-fungal agents. *Heliyon* 2020;6:e04663.
15. Vanittanakom N, Cooper Jr CR, Fisher MC, Sirisanthana T. *Penicillium marneffei* infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:95-110.
16. Walsh TJ, Pizzo A. Treatment of systemic fungal infections: recent progress and current problems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988;7:460-75.
17. University of ADELAID. Mycoses. [Internet]. C2021 – [cited 2022 Apr 10]. Available from: <https://www.adelaide.edu.au/mycology/mycoses>.
18. Souza AC, Amaral AC. Antifungal therapy for systemic mycosis and the nanobiotechnology era: improving efficacy, biodistribution and toxicity. *Front Microbiol* 2017;8:336.
19. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* 2017;17:e383-92.
20. Wongsuk T, Sukphopetch P. Effect of Quorum Sensing Molecules on *Aspergillus fumigatus*. *Walailak J Sci & Tech* 2020;17: 348-58.
21. Kitisin T, Muangkaew W, Ampawong S, et al. Tryptophol coating reduces catheter-related cerebral and pulmonary infections by *Scedosporium apiospermum* *Infect Drug Resist* 2020;13:2495-2508.

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Sibiya MA, Raphoko L, Mangokoana D, et al. Induction of Cell Death in Human A549 Cells Using 3-(Quinoxaline-3-yl) Prop-2-ynyl Methanesulphonate and 3-(Quinoxaline-3-yl) Prop-2-yn-1-ol. *Molecules* 2019;24:1-16.