

## ผลของกรดฟิวซาริกต่อการยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์และการออกจากซิสต์ของเชื้ออะแคนทามีบา Effects of Fusaric Acid to Inhibit Encystment and Excystment of *Acanthamoeba* spp.

นฤมล บุญมัน<sup>1\*</sup>, จารุวรรณ ฉัตรทอง<sup>1</sup>, ศิริพรรณ บุญศิลป์<sup>2</sup>

Narumon Boonman<sup>1\*</sup>, Jaruwan Chutrtong<sup>1</sup>, Siriphan Boonsilp<sup>2</sup>

Received: 15 August 2018 ; Revised : 16 October 2018 ; Accepted: 2 November 2018

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของกรดฟิวซาริกต่อการเข้าสู่ซิสต์และการออกจากซิสต์ของอะแคนทามีบา 4 ไอโซเลต คือ AS กับ AR ที่แยกได้จากผู้ป่วยกระจกตาอักเสบ และ S3 กับ S5 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดิน โดย AS, AR และ S3 ถูกจัดจำแนกอยู่ในจีโนไทป์ T4 ส่วน S5 อยู่ในจีโนไทป์ T5 เมื่อทดสอบโทรโฟซอइटด้วยกรดฟิวซาริกที่ความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของค่า  $IC_{50}$  พบว่าสามารถยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์ของ AS ได้บางส่วน แต่ยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์ของ AR, S3 และ S5 ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อทดสอบซิสต์ด้วยกรดฟิวซาริกที่ความเข้มข้น 4 เท่าและ 8 เท่าของค่า  $IC_{50}$  พบว่ายับยั้งการออกจากซิสต์ของอะแคนทามีบาจีโนไทป์ T4 ได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ในขณะที่จีโนไทป์ T5 มีความทนทานต่อกรด ฟิวซาริกมากกว่า เนื่องจากยับยั้งการออกจากซิสต์หลังจาก 48 ชั่วโมงโดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ ดังนั้นการใช้กรด ฟิวซาริกร่วมกับสารต้านอะแคนทามีบาอื่นๆ อาจทำให้การควบคุมอะแคนทามีบามีประสิทธิภาพมากขึ้น

**คำสำคัญ:** อะแคนทามีบา กรดฟิวซาริก การเข้าสู่ซิสต์ การออกจากซิสต์

### Abstract

This research examined effects of fusaric acid on encystment and excystment of 4 *Acanthamoeba* isolates including AS and AR isolated from the keratitis patients and S3 and S5 isolated from soil samples. AS, AR and S3 were classified as the genotype T4 whereas S5 was T5. Trophozoites were treated with fusaric acid at concentrations  $0.5 \times IC_{50}$ . The results showed that fusaric acid partially interfered with AS encystment but it completely inhibited the encystment of the remaining isolates. Cysts were treated with fusaric acid at concentrations  $4 \times$  and  $8 \times IC_{50}$ . Fusaric acid potentially inhibited the excystment of T4 in concentration- and time-dependent manners. On the other hand, T5 was more resistant to fusaric acid since the inhibitory effect was observed after treatment for 48 hours and did not depend on concentration. Therefore, combination of fusaric acid with other anti-*Acanthamoeba* agents may improve *Acanthamoeba* control.

**Keywords:** *Acanthamoeba*, Fusaric acid, Encystment, Excystment

<sup>1</sup> คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา แขวงวชิระ เขตดุสิต กรุงเทพฯ 10300

<sup>2</sup> คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช แขวงวชิระ เขตดุสิต กรุงเทพฯ 10300

<sup>1</sup> Faculty of Science and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University, Vajira, Dusit, Bangkok, 10300, Thailand

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Navamindradhiraj University, Vajira, Dusit, Bangkok, 10300, Thailand

\* Corresponding author: Boonman N. Tel.: +66968561126 e-mail: narumon.bo@ssru.ac.th

## บทนำ

อะแคนทามีบาเป็นโปรโตซัวที่ดำรงชีวิตอิสระในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำจืด น้ำทะเล น้ำประปา สระว่ายน้ำ ระบบเครื่องปรับอากาศ คอนแทคเลนส์และตลับเลนส์<sup>1, 2, 3</sup> แต่เมื่อมีโอกาสเข้าสู่ร่างกายคนจะก่อโรคระยะจกตาอักเสบที่มีความรุนแรงจนทำให้ตาบอดได้ นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของโรคสมองอักเสบแบบแกรนูโลมาตัส และการติดเชื้ออะมีบาแบบแพร่กระจาย เช่น ไชน์สอักเสบเรื้อรัง ปอดอักเสบเรื้อรัง และแผลเรื้อรังที่ผิวหนัง ซึ่งทำให้เสียชีวิตได้<sup>4</sup> จึงมีความจำเป็นต้องมีการป้องกันและการรักษาโรคติดเชื้อ อะแคนทามีบาอย่างเหมาะสม แต่สารฆ่าอะแคนทา- มีบาที่ใช้ในปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ เนื่องจากเชื้อสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลับไปมาได้ระหว่างระยะโทรโฟซอยต์และระยะซิสต์ เมื่อมีการใช้สารเคมี เช่น น้ำยาล้างคอนแทคเลนส์<sup>5, 6</sup> หรือน้ำยาฆ่าเชื้อในระบบปรับอากาศ<sup>7</sup> และการใช้ยาสำหรับรักษาการติดเชื้อ<sup>2</sup> อะแคนทามีบาจะเปลี่ยนจากโทรโฟ-ซอยต์เข้าสู่ซิสต์ซึ่งมีผนังหุ้ม 2 ชั้นทำให้ทนทานต่อยาและสารเคมีต่างๆ ได้ดี เมื่อหยุดใช้ยาและสารเคมีเหล่านี้โทรโฟซอยต์จะออกมาจากซิสต์ ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนและก่อโรคได้<sup>8</sup> งานวิจัยก่อนหน้านี้ Boonman และคณะ<sup>9</sup> พบว่าราเอนโดไฟต์ *Fusarium fujikuroi* species complex Tlau3 ที่แยกได้จากต้นรวงจืดสามารถผลิตกรดฟิวซาริกซึ่งออกฤทธิ์ฆ่าโทรโฟซอยต์ของอะแคนทามีบาได้ โดยค่า IC<sub>50</sub> ต่อ AS, AR, S3 และ S5 เท่ากับ 0.31 ± 0.01, 0.33 ± 0.01, 0.33 ± 0.01 และ 0.66 ± 0.01 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งมีการออกฤทธิ์โดยรบกวนการทำงานของ คอนแทรกทโทลส์แควคูลอลจนทำให้เซลล์แตก ซึ่งกรด ฟิวซาริกอาจไปรบกวนการสร้างพลังงานหรือการเคลื่อนที่ของโครงสร้างภายในเซลล์จนคอนแทรกทโทลส์-แควคูลอลไม่สามารถทำงานตามปกติได้ ดังนั้นกรด ฟิวซาริกก็อาจส่งผลต่อการเข้าสู่ซิสต์และการออกจากซิสต์ของอะแคนทามีบาได้อีกด้วย

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์โดยใช้กรดฟิวซาริกในระดับความเข้มข้นต่ำกว่า IC<sub>50</sub> ทดสอบกับระยะโทรโฟ-ซอยต์ และการยับยั้งการออกจากซิสต์โดยใช้กรด ฟิวซาริกในระดับความเข้มข้นสูงกว่า IC<sub>50</sub> ทดสอบกับระยะซิสต์

## วิธีการศึกษา

**การเพาะเลี้ยงอะแคนทามีบาระยะโทรโฟ-ซอยต์**  
อะแคนทามีบาระยะโทรโฟซอยต์เพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ (Tissue culture flask) ขนาด 25 ตร.ซม. ที่มีอาหาร PYG medium (Proteose peptone 8.8 กรัม, Yeast extract 0.88 กรัม, Amoeba saline solution (ASS) 400

มิลลิลิตรผสมกับ Glucose 1 โมลาร์ ในอัตราส่วน 9:1) ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บโทรโฟซอยต์โดยนำไปแช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้โทรโฟซอยต์หลุดออกจากกันภาชนะ แล้วใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะชะเบาๆ ให้โทรโฟซอยต์หลุดออก แล้วใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยโทรโฟซอยต์ประมาณ 2-3 หยดใส่ใน Hemocytometer chamber เพื่อนับจำนวนโทรโฟซอยต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วปรับความหนาแน่นของโทรโฟซอยต์ด้วย MgCl<sub>2</sub> 50 มิลลิ-โมลาร์ ให้ได้ 1.6 × 10<sup>5</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร

## การเพาะเลี้ยงอะแคนทามีบาระยะซิสต์

อะแคนทามีบาระยะโทรโฟซอยต์เพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อขนาด 60 มิลลิเมตรที่มี 2% Non-nutrient agar (NNA; Agar 2 กรัม และ ASS 100 มิลลิลิตร) บนผิวหน้าเกลี่ยด้วย *E. coli* ที่ถูกทำลายด้วยความร้อน เพื่อใช้เป็นอาหารให้กับอะแคนทามีบา จากนั้นหยดซิสต์ 1 หยดลงไปตรงกลาง พับพาราฟิล์มที่ขอบจาน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ทำการเก็บซิสต์โดยเติม ASS ลงไป 1.5 มิลลิลิตร ใช้ ปิเปตดูด ASS ชะให้ทั่วผิวหน้า แล้วใช้ปิเปตปลายแบนชนิดที่ผิวหน้าวันเบาๆ เพื่อให้ซิสต์หลุดออก จากนั้นดูดสารแขวนลอยซิสต์ประมาณ 2-3 หยดใส่ใน Hemocytometer chamber เพื่อนับจำนวนซิสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ปั่นล้างซิสต์ด้วย ASS ที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วปรับความหนาแน่นของซิสต์ด้วย ASS ให้ได้ 1.6 × 10<sup>5</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร

## การทดสอบฤทธิ์ของกรดฟิวซาริกต่อการเข้าสู่ซิสต์

การทดสอบการยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์ได้พัฒนามาจากการทดสอบของ Dudley และคณะ<sup>10</sup> โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมทางลบ แต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ ดังนั้นกลุ่มทดลอง คือโทรโฟซอยต์ที่ทดสอบกับกรดฟิวซาริก โดยเตรียมกรดฟิวซาริกละลายในเมทานอล ให้มีความเข้มข้น 0.5 × IC<sub>50</sub> (Table 1) ใส่ใน 96-well tissue culture plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เปิดฝาทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อระเหยเมทานอลออกจนหมด เติม MgCl<sub>2</sub> 50 มิลลิ-โมลาร์ ลงไปหลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นใส่โทรโฟ-ซอยต์ที่เตรียมไว้ลงไปหลุมละ 25 ไมโครลิตร ส่วนกลุ่มควบคุมทางลบใช้โทรโฟซอยต์ที่อยู่ใน MgCl<sub>2</sub> โดยไม่มีกรดฟิวซาริก ทั้งสองกลุ่มถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ถ่ายรูปอะแคน

ทามีบาในแต่ละหลุมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับเพื่อ นับจำนวนอะแคนทามีบาทั้งระยะโทรโพซอยต์และซิสต์ จากนั้นใส่ Sodium dodecyl sulfate (SDS) ลงในแต่ละหลุมให้ได้ ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5% ทิ้งไว้ 2 นาที SDS จะทำลาย ระยะโทรโพซอยต์และซิสต์ที่ยังไม่สมบูรณ์ จึงเหลือเฉพาะซิสต์ ที่สมบูรณ์เท่านั้น ถ่ายรูปเพื่อบันทึกจำนวนซิสต์ที่เหลือ คำนวณ เปอร์เซนต์การเข้าสู่ซิสต์ (% Encystment) ดังนี้

$$\% \text{ Encystment} = \frac{\text{จำนวนซิสต์ที่สมบูรณ์}}{\text{จำนวนอะแคนทามีบาทั้งหมด}} \times 100$$

**การทดสอบฤทธิ์ของกรดฟิวซาริกต่อการออก จากซิสต์**

แบ่งการทดสอบเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลอง กลุ่ม ควบคุมทางลบ และกลุ่มควบคุมทางบวก แต่ละกลุ่มทำ 3 ซ้ำ โดยกลุ่มทดลองคือซิสต์ที่ทดสอบกับกรดฟิวซาริก ทำการเตรียมกรดฟิวซาริกละลายในเมทานอลให้ความเข้มข้น 4x และ 8xIC<sub>50</sub> (Table 1) ใส่ใน 96-well tissue culture plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เปิดฝาทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อ ระเหยเมทานอล ออกจนหมด เติม ASS ลงไปหลุมละ 25 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ซิสต์ที่เตรียมไว้ลงไปหลุมละ 25 ไมโครลิตร สำหรับกลุ่มควบคุมทางลบใช้ซิสต์ที่อยู่ใน ASS โดยไม่มีกรดฟิวซาริก ส่วนกลุ่มควบคุมทางบวกใช้ซิสต์ที่อยู่ใน Polyhexamethylene biguanide (PHMB) 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร การทดสอบทั้งหมดถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการออกจาก ซิสต์โดยปั่นล้างซิสต์ด้วย ASS 2 รอบ จากนั้นเพาะเลี้ยงซิสต์ เหล่านี้บน 2% NNA เกลี้ยผิวหน้าวันด้วย *E. coli* ที่ถูกทำลาย ด้วยความร้อน นับจำนวนซิสต์และโทรโพซอยต์ที่อยู่ในแต่ละ จาน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับทุกวันจนครบ 2 สัปดาห์ คำนวณเปอร์เซนต์การออกจากซิสต์ (% Excystment) ดังนี้

$$\% \text{ Excystment} = \frac{\text{จำนวนโทรโพซอยต์}}{\text{จำนวนอะแคนทามีบาทั้งหมด}} \times 100$$

**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ โปรแกรม IBM SPSS Statistics 23 ความแตกต่างของค่า เฉลี่ยเปอร์เซนต์การเข้าสู่ซิสต์ และความแตกต่างของค่าเฉลี่ย เปอร์เซนต์การออกจาก ซิสต์ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่ม

ควบคุมถูกวิเคราะห์โดยใช้วิธี Independent samples t-test ซึ่งจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ P-value < 0.05

**Table 1** Concentrations of fusaric acid treated with each *Acanthamoeba* isolate

Isolate	Concentrations of fusaric acid (µM)			
	IC <sub>50</sub>	0.5×IC <sub>50</sub>	4×IC <sub>50</sub>	8×IC <sub>50</sub>
AS	0.31	0.155	1.24	2.48
AR	0.33	0.165	1.32	2.64
S3	0.33	0.165	1.32	2.64
S5	0.66	0.33	2.64	5.28

**ผลการศึกษา**

**ผลของกรดฟิวซาริกต่อการเข้าสู่ซิสต์**

โดยปกติเมื่อเพาะเลี้ยงอะแคนทามีบาในอาหาร PYG Medium เชื้อจะอยู่ในระยะโทรโพซอยต์ แต่เมื่ออะแคนทามีบา อยู่ในสภาวะที่ไม่มีอาหารและมี MgCl<sub>2</sub> ชักนำให้อะแคนทามี บาสมากรเข้าสู่ระยะซิสต์ได้ โดยโทรโพซอยต์ของ AS ในกลุ่ม ควบคุมทางลบที่อยู่ใน MgCl<sub>2</sub> ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็น เวลา 24 ชั่วโมงสามารถเปลี่ยนเป็นระยะซิสต์ได้ถึง 87.333 ± 0.764 % และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 48 และ 72 ชั่วโมง มีจำนวนโทรโพซอยต์ที่เข้าสู่ระยะซิสต์เพิ่มขึ้นเป็น 90.000 ± 0.750 และ 90.333 ± 1.127 % ตามลำดับ แต่เมื่อโทรโพซอยต์ถูก ทดสอบด้วยกรด ฟิวซาริกที่ความเข้มข้น 0.5× IC<sub>50</sub> พบว่าไม่ ทำให้โทรโพซอยต์ตาย แต่มีเปอร์เซนต์การเข้าสู่ระยะ ซิสต์ ลดลงเหลือเพียง 18.000 ± 3.072 % ที่เวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่า จำนวนซิสต์จะเพิ่มขึ้นเป็น 33.667 ± 0.878 และ 36.000 ± 1.250 % ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การเข้าสู่ซิสต์ระหว่างกลุ่มควบคุม ทางลบและกลุ่มทดลองที่เวลาเท่ากันพบว่ามีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.001) ดังแสดงใน Figure 1A โทรโพซอยต์ของ AR เมื่ออยู่ใน MgCl<sub>2</sub> เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงสามารถเข้าสู่ซิสต์ได้ แต่มีจำนวนน้อยกว่าเชื้อ AS โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การเข้าสู่ซิสต์เท่ากับ 25.417 ± 0.144, 30.083 ± 0.764 และ 31.917 ± 0.629 % ตามลำดับ แต่โทรโพซอยต์ที่ถูกทดสอบด้วยกรดฟิวซาริกที่ความเข้มข้น 0.5× IC<sub>50</sub> ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นระยะซิสต์ได้ในทุกช่วงเวลา ที่ทดสอบ ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมทางลบอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ (P < 0.001) ดังแสดงใน Figure 1B โทรโพซอยต์ของ S3 ในกลุ่มควบคุมทางลบสามารถ เข้าสู่ระยะซิสต์ได้ค่อนข้างน้อย คือ 4.167 ± 0.520, 4.917 ± 0.382 และ 6.083 ± 0.382 % ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเข้าสู่ซิสต์ยังคงแตกต่างจากกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.005$ ,  $P = 0.002$  และ  $P = 0.001$ ) เนื่องจากกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $0.5 \times IC_{50}$  ทำให้ S3 อยู่ในระยะโทรโพออยด์ทั้งหมด ไม่สามารถเข้าสู่ซิสต์ได้ ดังแสดงใน Figure 1C

การเข้าสู่ระยะซิสต์ของ S5 ในกลุ่มควบคุมทางลบมีความแตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ คือที่เวลา 24 ชั่วโมงมีจำนวนซิสต์เพียง  $2.500 \pm 0.433$  % แต่ก็ยังแตกต่างจากกลุ่มทดลองที่อยู่ในกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $0.5 \times IC_{50}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.01$ ) เนื่องจากโทรโพออยด์ทั้งหมดไม่สามารถเปลี่ยนเป็นระยะซิสต์ได้ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมงจำนวนซิสต์ในกลุ่มควบคุมทางลบเพิ่มขึ้นอย่างมากเป็น  $67.583 \pm 2.082$  % และเพิ่มขึ้นอีกเป็น  $91.750 \pm 1.953$  % ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้ามโทรโพออยด์ของ S5 ที่อยู่ในกลุ่มทดลองไม่สามารถเข้าสู่ซิสต์ได้ และยังคงอยู่ในระยะโทรโพออยด์ทั้งหมด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ ( $P < 0.001$ ) ดังแสดงใน Figure 1D

#### ผลของกรดฟิวซารีคต่อการออกจากซิสต์

ซิสต์ของ AS, AR, S3 และ S5 ถูกทดสอบด้วยกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $4 \times$  และ  $8 \times IC_{50}$  เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ซิสต์ใน ASS เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ และซิสต์ที่อยู่ใน PHMB 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นกลุ่มควบคุมทางบวก จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับพบว่ารูปร่างลักษณะซิสต์ของอะแคนทามีบาที่อยู่ใน ASS (Figure 2A, 2B) และซิสต์ทดสอบด้วยกรดฟิวซารีค (Figure 2E, 2F, 2G, 2H) ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ซิสต์ที่อยู่ใน PHMB มีรูปร่างลักษณะของโครงสร้างภายในที่ถูกทำลาย (Figure 2C, 2D) และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบน NNA ไม่พบโทรโพออยด์ออกมาแสดงว่า PHMB สามารถฆ่าซิสต์ได้ แต่กรดฟิวซารีคไม่ฆ่าซิสต์อย่างไรก็ตามหลังจากนำซิสต์ที่ทดสอบด้วยกรดฟิวซารีคมาเพาะเลี้ยงบน NNA พบว่ามีโทรโพออยด์ออกมาจากซิสต์ได้เช่นเดียวกับซิสต์ที่อยู่ใน ASS ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมทางลบ แต่เปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบโทรโพออยด์ออกมาจากซิสต์ในวันแรกๆ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์เพิ่มขึ้นภายใน 7 วัน หลังจากนั้นลดลงเนื่องจากโทรโพออยด์บางส่วนเปลี่ยนกลับไปเป็นระยะซิสต์ ดังนั้นในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติจึงใช้การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์ในวันที่มีค่าสูงสุดของกลุ่มควบคุมทางลบกับกลุ่มทดลอง

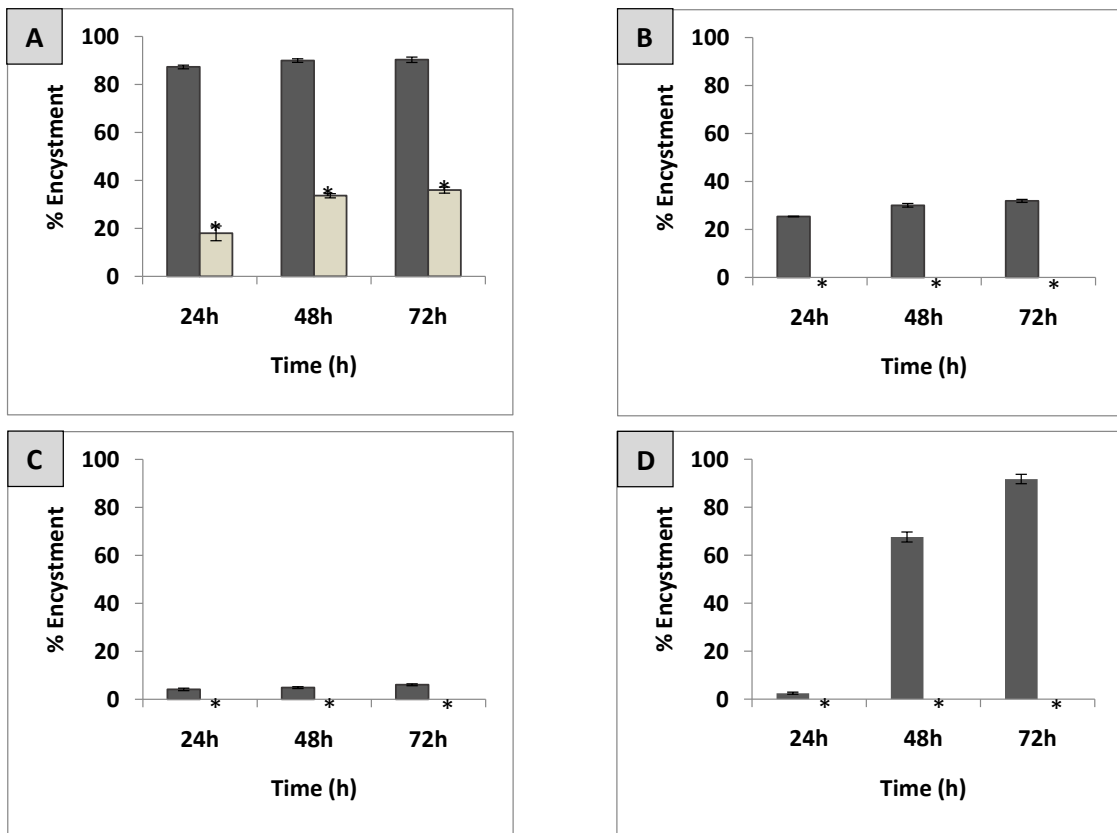
ซิสต์ของ AS ที่อยู่ใน ASS เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์สูงสุดในวันที่ 3 คือ  $64.917 \pm 2.765$  % ส่วนซิสต์ที่ทดสอบด้วยกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $4 \times IC_{50}$  มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์สูงสุดในวันที่ 6 คือ  $53.667 \pm 1.041$  % ซึ่งน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.003$ ) ส่วนซิสต์ที่ทดสอบด้วยกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $8 \times IC_{50}$  มีโทรโพออยด์ออกมาจากซิสต์สูงสุดในวันที่ 2 คือ  $14.500 \pm 2.634$  % ซึ่งน้อยกว่าซิสต์ในกลุ่มควบคุมทางลบและซิสต์ที่ถูกทดสอบด้วยกรดฟิวซารีค  $4 \times IC_{50}$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) ดังแสดงใน Figure 3A ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ากรดฟิวซารีคสามารถยับยั้งการออกจากซิสต์ของเชื้อ AS ได้โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ เมื่อเพิ่มเวลาในการทดสอบเป็น 48 ชั่วโมงพบว่า AS ใน ASS มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์สูงสุดในวันที่ 3 คือ  $65.250 \pm 3.250$  % ซึ่งใกล้เคียงกับผลที่ได้จากที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนซิสต์ที่ทดสอบด้วยกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $4 \times$  และ  $8 \times IC_{50}$  มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์สูงสุดในวันที่ 1 คือ  $8.000 \pm 1.146$  % และ  $10.583 \pm 2.626$  % ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) ดังแสดงใน Figure 3B ซึ่งแสดงว่าการออกฤทธิ์ของกรดฟิวซารีคในการยับยั้งการออกจากซิสต์ขึ้นกับเวลาที่ใช้ทดสอบด้วย โดยเมื่อซิสต์อยู่ในกรดฟิวซารีคนานขึ้น การออกจากซิสต์ยิ่งน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการใช้ความเข้มข้นเท่ากัน

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์ที่ได้จาก AR ในกลุ่มควบคุมทางลบและในกลุ่มที่ทดสอบด้วยกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $4 \times IC_{50}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.092$ ) ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $64.833 \pm 4.072$  % และ  $59.417 \pm 1.233$  % ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟิวซารีคเป็น  $8 \times IC_{50}$  พบว่ามีค่าเท่ากับ  $51.417 \pm 3.394$  % ซึ่งน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมทางลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P = 0.012$ ) ดังแสดงใน Figure 3C ผลที่ได้สอดคล้องกับของเชื้อ AS ที่การออกฤทธิ์ยับยั้งการออกจากซิสต์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ นอกจากนี้ระยะเวลาในการทดสอบก็มีผลต่อการยับยั้งการออกจากซิสต์ด้วย โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์ของ AR ที่ทดสอบด้วยกรดฟิวซารีคที่ความเข้มข้น  $4 \times$  และ  $8 \times IC_{50}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีค่าสูงสุดในวันที่ 7 คือ  $55.083 \pm 2.126$  % และ  $49.333 \pm 2.126$  % ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซิสต์ของกลุ่มควบคุมทางลบ คือ  $66.583 \pm 3.394$  % อย่างมีนัยสำคัญทาง

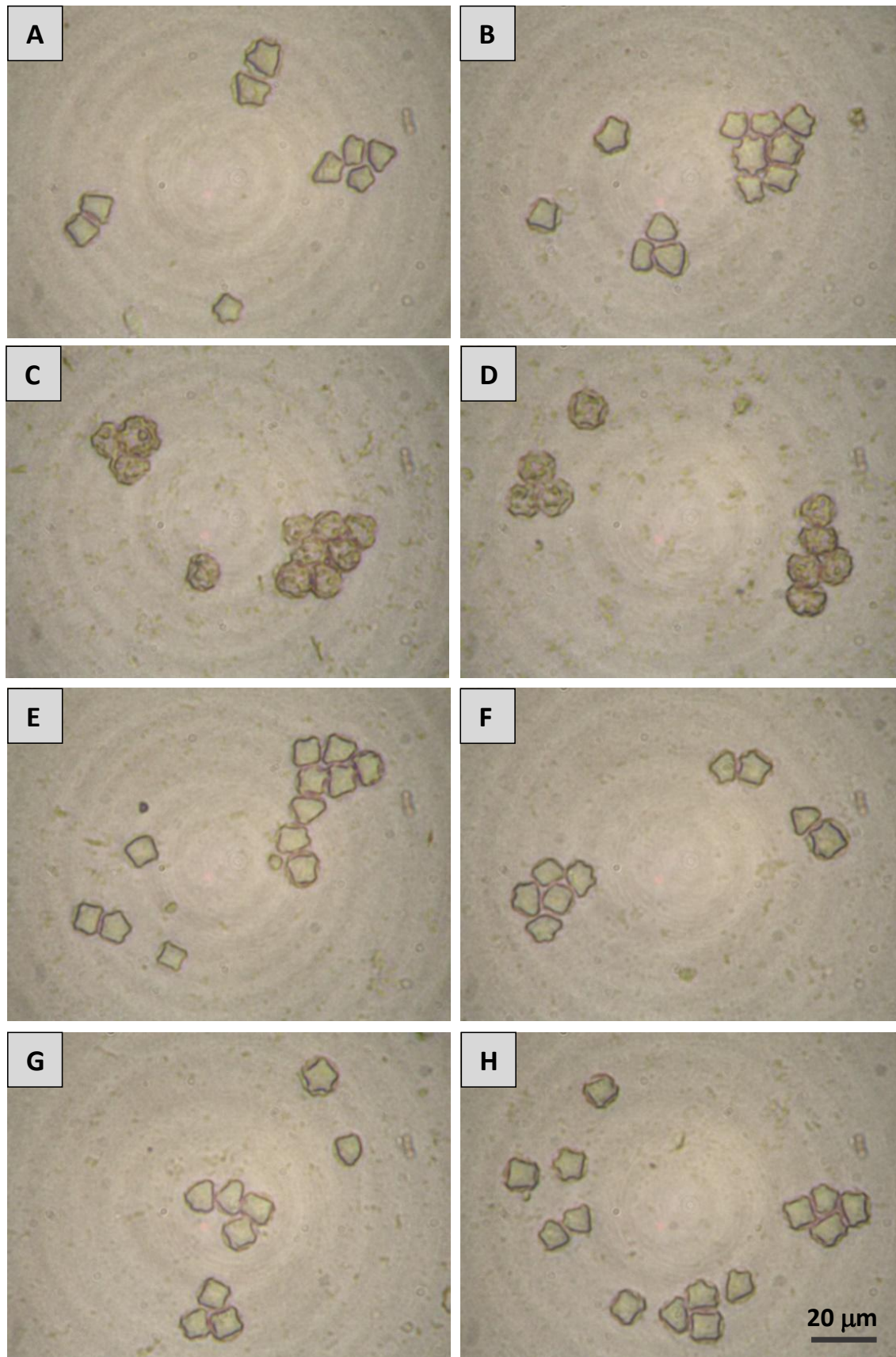
สถิติโดยมีค่า  $P = 0.008$  และ  $P = 0.002$  ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 3D

การทดสอบกรดฟิวซาริกกับซีสต์ของ S3 ให้ผลในลักษณะเดียวกับ AR คือ เมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้น  $4 \times IC_{50}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไม่สามารถยับยั้งการออกจากซีสต์ได้ เนื่องจากค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซีสต์สูงสุดคือ  $81.750 \pm 2.411 \%$  ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทางลบ คือ  $82.583 \pm 4.163 \%$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า  $P = 0.779$  แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดฟิวซาริกเป็น  $8 \times IC_{50}$  ให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซีสต์  $25.083 \pm 1.942 \%$  ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมทางลบอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) ดังแสดงใน Figure 3E และเมื่อใช้เวลาทดสอบเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง กรดฟิวซาริกทั้งที่ความเข้มข้น  $4 \times$  และ  $8 \times IC_{50}$  สามารถยับยั้งการออกจากซีสต์ของ S3 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซีสต์เท่ากับ  $26.500 \pm 2.947 \%$  และ  $24.083 \pm 4.072 \%$  ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าผลที่ได้จากกลุ่มควบคุมทางลบ คือ  $81.250 \pm 2.136 \%$  อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) ดังแสดงใน Figure 3F

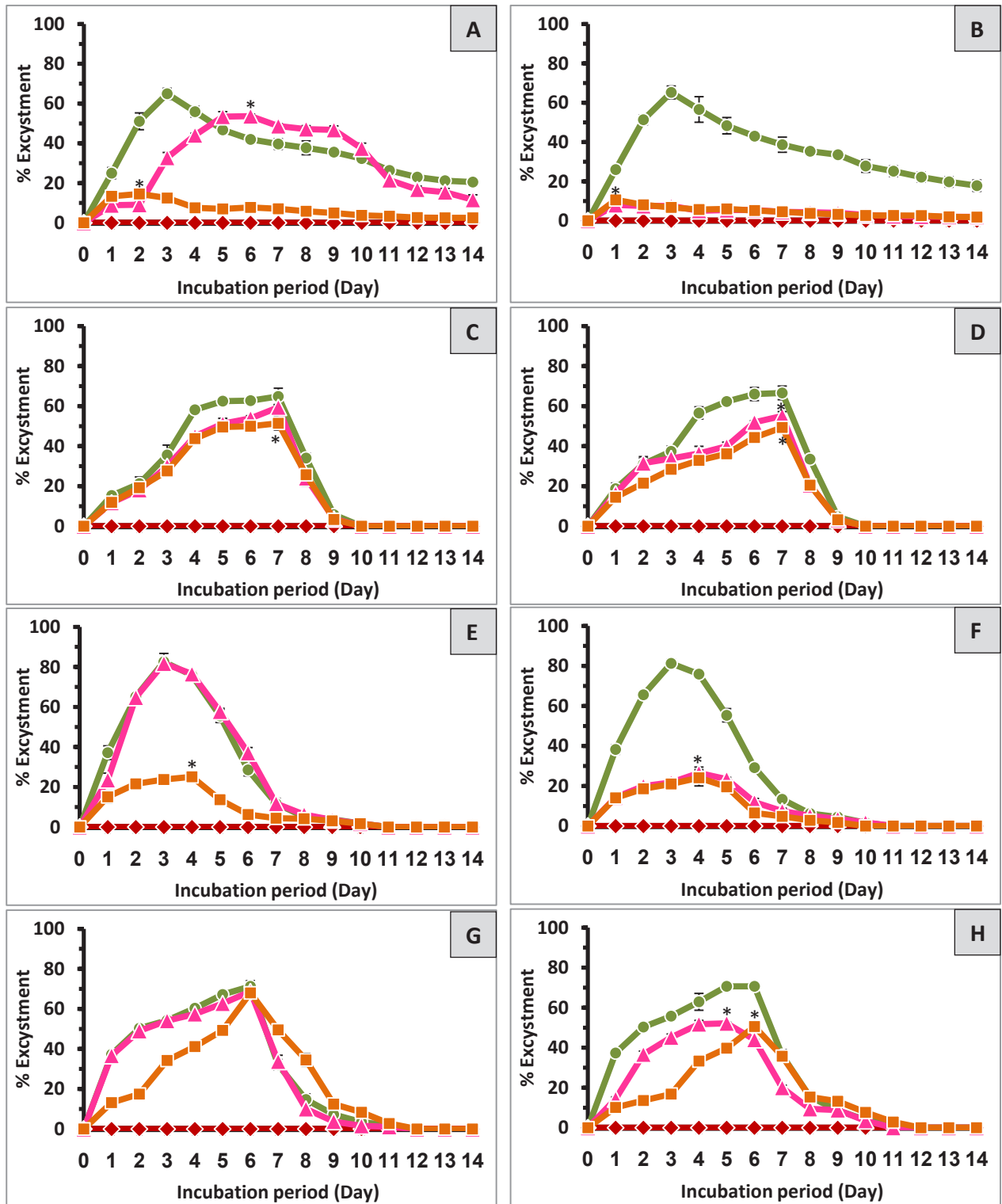
ซีสต์ของ S5 มีความทนทานต่อการยับยั้งการออกจากซีสต์โดยกรดฟิวซาริกมากกว่า AS, AR และ S3 เนื่องจากการทดสอบด้วยกรดฟิวซาริกที่ระดับความเข้มข้น  $4 \times$  และ  $8 \times IC_{50}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไม่สามารถยับยั้งการออกจากซีสต์ของ S5 ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซีสต์เท่ากับ  $68.667 \pm 0.629 \%$  และ  $68.000 \pm 1.561 \%$  ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทางลบ คือ  $71.250 \pm 2.817 \%$  อย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.250$  และ  $P = 0.155$  ตามลำดับ) ดังแสดงใน Figure 3G แต่กรดฟิวซาริกสามารถยับยั้งการออกจากซีสต์ของ S5 ได้เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 48 ชั่วโมง ซีสต์ที่ทดสอบด้วยกรดฟิวซาริกที่ระดับความเข้มข้น  $4 \times$  และ  $8 \times IC_{50}$  มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การออกจากซีสต์สูงสุดเท่ากับ  $52.167 \pm 0.577 \%$  และ  $50.583 \pm 1.258 \%$  ตามลำดับ แต่ซีสต์ที่อยู่ในกลุ่มควบคุมทางลบมีค่าเท่ากับ  $70.667 \pm 1.665 \%$  ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.001$ ) ดังแสดงใน Figure 3H แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดสอบด้วยกรดฟิวซาริกที่ระดับความเข้มข้น  $4 \times$  และ  $8 \times IC_{50}$  ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P = 0.119$ ) แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของกรดฟิวซาริกในการยับยั้งการออกจากซีสต์ของ S5 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่มากกว่าความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ



**Figure 1** Average % Encystment of AS (A), AR (B), S3 (C) and S5 (D) trophozoites in negative control (■) and Fusaric acid treatment (□) at 24, 48 and 72 hours (\* means significant difference compared to the negative control at  $P < 0.05$ )



**Figure 2** Morphological appearance of S3 cysts observed under inverted light microscope at 24 (A, C, E, G) and 48 (B, D, F, H) hours. The photographs show cysts in ASS (A, B), treated with PHMB (C, D), treated with fusaric acid at  $4 \times IC_{50}$  (E, F) and  $8 \times IC_{50}$  (G, H). The bar measures 20  $\mu$ m.



**Figure 3** Average % Excystment of AS (A, B), AR (C, D), S3 (E, F) and S5 (G, H) cysts in ASS (green circles), PHMB (red diamonds), 4xIC<sub>50</sub> (pink triangles) and 8xIC<sub>50</sub> (orange squares) fusaric acid treatment at 24 (A, C, E, G) and 48 (B, D, F, H) hours. (\* means significant difference compared to ASS at P < 0.05)

## วิจารณ์และสรุปผล

อะแคนทามีบาสามารถเปลี่ยนรูปร่างไปมาระหว่างระยะโทรโพซอยต์ และระยะซิสต์ได้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยในสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการดำรงชีวิตอะแคนทามีบาจะเข้าสู่ซิสต์ เป็นการปรับตัวเพื่อให้ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ ซึ่งทำให้การป้องกันและการรักษาการติดเชื้ออะแคนทามีบาได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร<sup>11</sup> มีการรายงานว่าน้ำยาล้างคอนแทคเลนส์บางชนิด นอกจากฆ่าโทรโพซอยต์ของอะแคนทามีบาไม่ได้แล้ว ยังชักนำให้เกิดการเข้าสู่ซิสต์ ทำให้อะแคนทามีบาถูกกำจัดยากยิ่งขึ้น<sup>6</sup>

ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่ากรดฟิวซารีคที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่สามารถฆ่าโทรโพซอยต์ได้จะส่งผลอย่างไรต่อการเข้าสู่ซิสต์ งานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบโทรโพซอยต์ของ AS, AR, S3 และ S5 ด้วยกรดฟิวซารีคที่ระดับความเข้มข้นครึ่งหนึ่งของค่า IC<sub>50</sub> พบว่าสามารถยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์ของ AS ได้บางส่วน แต่สำหรับ AR, S3 และ S5 การเข้าสู่ซิสต์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ โดยอะแคนทามีบายังอยู่ในระยะโทรโพซอยต์ทั้งหมดไม่สามารถเข้าสู่ซิสต์ได้แม้จะผ่านไปนานถึง 72 ชั่วโมงก็ตาม แสดงให้เห็นว่ากรดฟิวซารีคออกฤทธิ์ยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์ของเชื้อจีโนไทป์ T4 (AS, AR และ S3) กับจีโนไทป์ T5 (S5) ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเมื่ออะแคนทามีบาถูกยับยั้งไม่ให้เข้าสู่ซิสต์จะช่วยทำให้ทำลายเชื้อได้ง่ายขึ้นในการทดสอบกรดฟิวซารีคกับซิสต์ต้องใช้ความเข้มข้นมากขึ้น คือ 4 เท่าและ 8 เท่าของค่า IC<sub>50</sub> เนื่องจากซิสต์มีความทนทานต่อยาและสารเคมีมากกว่าโทรโพซอยต์ แม้ว่ากรดฟิวซารีคจะไม่สามารถฆ่าซิสต์ของอะแคนทามีบาได้ แต่ยับยั้งการออกจากซิสต์ได้ โดยการออกฤทธิ์ยับยั้งการออกจากซิสต์ของเชื้อจีโนไทป์ T4 ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ แต่เชื้อจีโนไทป์ T5 มีความทนทานต่อกรดฟิวซารีคมากกว่า โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาเท่านั้น แต่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ แสดงให้เห็นว่ากรดฟิวซารีคอาจเป็นประโยชน์ในการควบคุมอะแคนทามีบาที่อยู่ในระยะซิสต์ให้ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นโทรโพซอยต์ที่จะก่อโรคได้

แม้ว่า PHMB จะมีประสิทธิภาพในการทำละลายทั้งโทรโพซอยต์และซิสต์ได้ดี แต่ก็ยังเป็นพิษต่อเซลล์ของคนได้เช่นกัน<sup>12</sup> ในน้ำยาล้างคอนแทคเลนส์ส่วนใหญ่จะมี PHMB หรือ Chlorhexidine ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ แม้ว่าฆ่าแบคทีเรียได้แต่ไม่สามารถทำลายอะแคนทามีบาได้<sup>13</sup> โดยเฉพาะระยะซิสต์ที่มีผนังหุ้ม 2 ชั้น จึงมีความทนทานต่อสารเคมีต่างๆ เนื่องจากเซลล์โลสเป็นส่วนประกอบหลักของผนังซิสต์ จึงเป็นเป้าหมายสำคัญในการพัฒนาสารต้านอะแคนทามีบา Moon และคณะ<sup>12</sup> ได้ใช้สารยับยั้งการสร้างเซลล์โลส คือ 2,6-dichloro-benzonitrile ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ หรือ Isoxaben ที่ความเข้มข้น

10 ไมโครโมลาร์ พบว่าออกฤทธิ์ยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์ได้ แต่เมื่อใช้ร่วมกับ 0.00125% PHMB พบว่าสามารถทำลายอะแคนทามีบาได้มากกว่าการใช้สารเคมีแต่ละชนิดเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ Abjani และคณะ<sup>14</sup> พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลส 50 หน่วยร่วมกับ Chlorhexidine ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครโมลาร์ และน้ำยาล้างคอนแทคเลนส์ที่ขายตามท้องตลาดสามารถทำลายโทรโพซอยต์และซิสต์ได้มากขึ้น

แต่กลไกการออกฤทธิ์ของกรดฟิวซารีคต่ออะแคนทามีบาอาจจะไม่ได้มีเป้าหมายที่เซลล์โลส เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากรดฟิวซารีคสามารถออกฤทธิ์ได้หลากหลาย ได้แก่ 1) เปลี่ยนความสามารถในการเข้าออกของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ของรากและใบพืชชนิดต่างๆ 2) ยับยั้งกระบวนการหายใจภายในไมโทคอนเดรียทำให้จำนวน ATP ลดลง 3) ทำให้เกิดการรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ 4) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์<sup>15-18</sup> อาจเป็นไปได้ว่าการออกฤทธิ์ยับยั้งการเข้าสู่ซิสต์และการออกจากซิสต์ของอะแคนทามีบาเป็นผลมาจากการรบกวนกระบวนการหายใจภายในไมโทคอนเดรียจน ATP ภายในเซลล์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างระหว่างโทรโพซอยต์และซิสต์เป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบและโครงสร้างภายในเซลล์อย่างมาก ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิด และใช้ ATP ในหลายขั้นตอน<sup>11</sup>

ทางผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะว่าควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการใช้กรดฟิวซารีคร่วมกับ PHMB หรือ Chlorhexidine และสารที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์โลสเป็นส่วนประกอบในน้ำยาล้างคอนแทคเลนส์หรือน้ำยาฆ่าเชื้อต่างๆ เพื่อเสริมฤทธิ์กันทำให้มีประสิทธิภาพควบคุมการแพร่กระจายของอะแคนทามีบาได้ดียิ่งขึ้น แต่หากใช้เพื่อรักษาการติดเชื้ออะแคนทามีบาต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง แม้โทรโพซอยต์จะถูกทำลายได้ง่ายกว่าซิสต์ แต่เป็นระยะก่อโรคจึงอาจทำให้ผู้ป่วยมีอาการของโรครุนแรงขึ้นได้ในช่วงก่อนที่โทรโพซอยต์จะถูกทำลาย

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากทุนมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ประเภทงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2558 และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง

## เอกสารอ้างอิง

1. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans, Clin Microbiol Rev. 2003;16(2):273-307



2. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):564-595
3. นฤมล บุญมั่น, เกล็ดดาว จันทรังษี, วิลาสินี อินทรินทร์, ศิริพรรณ บุญศิลป์, อารยา ชูสัตยานนท์. การตรวจพบอะแคนทามีบาจากตัวอย่างฝุ่นที่เก็บจากเครื่องปรับอากาศแบบรวมศูนย์. ใน: เอกสารการประชุมสวนสุนันทาวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 1. โรงแรม เดอะรอยัลริเวอร์. กรุงเทพฯ; 2557. หน้า 359-363
4. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol. 1997; 7(1):583-598
5. Johnston SP, Sriram R, Qvarnstrom Y, et al. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection in multiple contact lens solutions. J Clin Microbiol. 2009;47(7):2040-2045
6. Lonnen J, Heaselgrave W, Nomachi M, et al. Disinfection efficacy and encystment rate of soft contact lens multipurpose solutions against *Acanthamoeba*. Eye Contact Lens. 2010;36(1): 26-32.
7. Srikanth S, Berk SG. Stimulatory effect of cooling tower biocides on amoebae. Appl Environ Microbiol. 1993;59(10):3245-3249.
8. Anwar A, Khan NA, Siddiqui R. Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: what are the options?. Parasites & vectors. 2018;11(1):26
9. Boonman N, Prachya S, Boonmee A, et al. *In vitro* acanthamoebicidal activity of fusaric acid and dehydrofusaric acid from an endophytic fungus *Fusarium* sp. Tlau3. Planta Med. 2012;78:1562-1567
10. Dudley R, Matin A, Alsam S, Sissons J, Maghsood AH, Khan NA. *Acanthamoeba* isolates belonging to T1, T2, T3, T4 but not T7 encyst in response to increased osmolarity and cysts do not bind to human corneal epithelial cells. Acta tropica. 2005;95(2):100-108
11. Lloyd D. Encystment in *Acanthamoeba castellanii*: a review. Exp parasitol. 2014;145: S20-S27
12. Moon EK, Hong Y, Chung DI, Goo YK, Kong H H. Potential value of cellulose synthesis inhibitors combined with PHMB in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Cornea. 2015;34(12): 1593-1598
13. Lakhundi S, Khan NA, Siddiqui R. Inefficacy of marketed contact lens disinfection solutions against keratitis-causing *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. Exp parasitol. 2014;141:122-128
14. Abjani F, Khan NA, Yousuf FA, Siddiqui R. Targeting cyst wall is an effective strategy in improving the efficacy of marketed contact lens disinfecting solutions against *Acanthamoeba castellanii* cysts. Contact Lens and Anterior Eye 2016;39(3):239-243
15. Arias JA. Secretory organelle and mitochondrial alterations induced by fusaric acid in root cells of *Zea mays*. Physiol Plant Pathol. 1985;27:149-158.
16. D' Alton A, Etherton B. Effects of fusaric acid on tomato root hair membrane potentials and ATP levels. Plant Physiol. 1984;74:39-42
17. Marrè MT, Vergani P, Albergoni FG. Relationship between fusaric acid uptake and its binding to cell structures by leaves of *Egeria densa* and its toxic effects on membrane permeability and respiration. Physiol Mol Plant P. 1993;42:141-157
18. Pavlovkin J, Mistrik I, Prokop M. Some aspects of the phytotoxic action of fusaric acid on primary *Ricinus* roots. Plant Soil Environ. 2004;50:397-401