รายการอ้างอิง

1. ดาริกา กิ่งเนตร. คู่มือวิชาการโรคเลปโตสไปโรซีส. กองโรคติดต่อทั่วไป กรมควบคุมโรคติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, 2544.
2. คำนวณ อึ้งชูศักด์. สถานการณ์การระบาดโรคเลปโตสไปโรซิสที่เกิดขึ้นในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2539 ถึงปี พ.ศ. 2544. ใน: การสัมมนาวิชาการโรคเลปโตสไปโรซิส ประจำปี 2545, หน้า 33-38. กรมควบคุมโรคติดต่อ: 2545.
3. Levett PN. Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 2001;14 (2) : 296-326.
4. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. The spirochetes. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM, editors. Zinsser microbiology, 19th eds. p 555-71. California: Appleton & Lange, 1988;
5. Yang CW, Wu MS, Pan MJ. Leptospirosis renal disease. Nephrol Dial Transplant 2001;16 (Suppl 5) : 73-7.
6. Areans VM. The pathological anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). Am J Path 1962 ; 40 : 393.
7. Sitprija V, Pipatanagul V, Mertowidjojo K, et al. Pathogenesis of renal disease in leptospirosis: Clinical and experimental studies. Kidney Int 1980;17(6) : 827-36.
8. Isogai E, Isogai H, Kurebayashi Y, Ito N. Biological activities of leptospiral lipopolysaccharide. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 1986;261(1) : 53-64.
9. Cinco M, Vecile E, Murgia R, Dobrina P, Dobrina A. Leptospira interrogans and Leptospira peptidoglycans induce the release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes. FEMS Microbiol Lett 1996;138(2-3) : 211-4.
10. Ballard SA, Williamson M, Adler B, Vinh T, Faine S. Interactions of virulent and avirulent leptospires with primary cultures of renal epithelial cells. J Med Microbiol 1986;21(1) : 59-67.
11. Pereira MM, Andrade J, Lacerda MD, et al. Demonstration of leptospiral antigens on tissues using monoclonal antibodies and avidin-biotin peroxidase staining. Exp Toxicol Pathol 1997;49(6) : 505-11.
12. Barnett JK, Barnett D, Bolin CA, et al. Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. Infect Immun 1999;67(2) : 853-61.

13. Yang CW, Wu MS, Pan MJ, et al. Leptospira outer membrane protein activates NF-kappaB and downstream genes expressed in medullary thick ascending limb cells. J Am Soc Nephrol 2000;11(11) : 2017-26.

14. Compton SJ, Cairns JA, Holgate ST, Walls AF. The role of mast cell tryptase in regulating endothelial cell proliferation, cytokine release, and adhesion molecule expression: tryptase induces expression of mRNA for IL-1 beta and IL-8 and stimulates the selective release of IL-8 from human umbilical vein endothelial cells. J Immunol 1998;161(4) : 1939-46.

15. Taramelli D, Basilico N, De Palma AM, et al. The effect of synthetic malaria pigment (beta-haematin) on adhesion molecule expression and interleukin-6 production by human endothelial cells. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998;92(1) : 57-62.

16. Furchgott RF. Role of endothelium in response of vascular smooth muscle. Circ Res 1983; 53 : 557-73.

17. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. Leptospira and leptospirosis. 2nd ed. Melbourne: MediSci, 1999.

18. Mitchison M, Bulach DM, Vinh T, et al. Identification and characterization of the dTDP-rhamnose biosynthesis and transfer genes of the lipopolysaccharide-related rfb locus in Leptospira interrogans serovar Copenhageni. J Bacteriol 1997;179(4) : 1262-7.

19. Guerreiro H, Croda J, Flannery B, et al. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. Infect Immun 2001;69(8) : 4958-68.

20. Charon NW and Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes. Ann Rev Genet 2002;36 : 47-73.

21. Johnson RC. *Leptospira*. [online]. Available from:http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch035.htm

22. Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. Lancet Infect Dis 2003 ;3(12) : 757-71.

23. Bao L, Dai BM. [Endocytosis and cytotoxin effect induced by the attachment of the glycolipoprotein of leptospires to vascular endothelial cell in culture] Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 1989;20(2) : 115-8. Chinese

24. Vijayachari P, Sehgal SC, Goris MG, et al. Leptospira interrogans serovar Valbuzzi: a cause of severe pulmonary haemorrhages in the Andaman Islands. J Med Microbiol 2003;52(10) : 513-8.

25. Luks AM, Lakshminarayanan S, Hirschmann JV. Leptospirosis presenting as diffuse alveolar hemorrhage: case report and literature review. Chest 2003;123(2) : 639-43.

26. Farrelly HE, Adler B, Faine S. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide antigens of Leptospira interrogans serovar hardjo. J Med Microbiol 1987 Feb;23(1) : 1-7.

27. Sanford JP. Leptospirosis. In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Joseph B, Fauci A and Kasper DL, et al. Harrison's principles of internal medicine Vol 1. 13th ed. pp.740-3. New York: McGraw-Hill, 1994.

28. Kumar P, Clark M. Infectious diseases, tropical medicine and sexually transmitted diseases. In: Finch RG, Moss P, Jeffries DJ and Anderson J, editors. Clinical Medicine, pp.21-152. London: W.B.Saunders, 2002.

29. Dobrina A, Nardon E, Vecile E, Cinco M, Patriarca P. Leptospira icterohemorrhagiae and leptospire peptidolgycans induce endothelial cell adhesiveness for polymorpho nuclear leukocytes. Infect Immun 1995;63(8) : 2995-9.

30. Haake DA, Chao G, Zuerner RL, Barnett JK, Barnett D, Mazel M, Matsunaga J, Levett PN, Bolin CA. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. Infect Immun 2000;68(4) : 2276-85.

31. Salton RJM, Kim SK. Bacterial cell structure. [online]. Available from: URL:http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch002.html

32. Fix D. General microbiology. Avilable from: URL: http://www.cehs.siu.edu/fix/medmicro/genmicr.htm

33. Boulanger CM, Vonhoutte PM. The endothelium : Pivotal role in health and cardiovascular diesease. pp.1-64. Neuilly sur Seine : Servier Drug company, 1994.

34. Rubanyi GM. Endothelium-dervied relaxing and contractiong factors. J Cell Biochem 1991;46 : 27-36.

35. Meidell RS. Southwestern Internal Medicine Conference: endothelial dysfunction and vascular disease. Am J Med Sci 1994;307 : 378-89.

36. Pfeilschifter J , Eberhardt W , Huwiler A . Nitric oxide and mechanisms of redox signalling : matrix and matrix-metabolizing enzymes as prime nitric oxide targets. Eur J Pharmacol 2001;429 : 279-86.

37. Vane JR, Anggard EE, Regina MB. Regulatory functions of the vascular endothelium. N Engl J Med 1990;323 : 27-36.

38. Henrich WL. The endothelium - a key regulator of vascular tone. Am J Med Sci 1991;302 : 319-28.

39. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. Cell Mol Life Sci 1999;55 : 1078-87.

40. Vanhoutte PM, Mombouli JV. Vascular endothelium : vasoactive mediators. Prog Cardiovasc Dis 1996;39 : 229-38.

41. Takano T, Brady HR. The endothelium in glomerular inflammation. Curr Opin Nephrol Hypertens 1995;4 : 277-86.

42. Butler AR, Flitney FW, Williams DL. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. Trends Pharmacol Sci 1995;16 : 18-22.

43. Moncada S. Nitric oxide. J Hypertens Suppl 1994;12 : S35-9.

44. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Garder P. editors. Nitric oxide. In : Pharmacology. 4th ed. pp.279-81.New York: Churchill Livingstone, 2001.

45. สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ. อิมมูโนวิทยา. ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: บริษัท พีพีเอส ซายน์ เทคนิคัล จำกัด, 2543.

46. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, eds. Basic & Clinical Immunology, 8th ed. pp.105-23. Stamford: Appleton & Lange, 1994.

47. Bey RF, Auran NE, Johnson RC. Immunogenicity of whole cell and outer envelope leptospiral vaccines in hamster. Infect Immun 1974;10 : 1051-6.

48. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72 : 248-54.

49. Weiss SA, Whitford WG, Gorfien SF, Godwin GP. Insect cell-culture techniques in serum-containing medium. Medthods Mol Biol 1995;39 : 65-78.

50. Maruyama Y. The human endothelial cell tissue culture. Z Zellforsch-Mikrosk Anat 1963;60 : 69-79.

51. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG and Minick CR: Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. J Clin Invest 1973;52 : 2745-2756.

52. Thamaree S, Sitprija V, Punyavoravuth V, Akarasereenont P, Puckmanee N, Khow A, Thaworn N. Effects of Russell's viper venom on mediator production in cultured human umbilical vein endothelial cells. J Med Assoc Thai 2001;84 Suppl1 : S197-207.

53. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65 : 55-63.

54. Suzuki S, Kassell NF, Lee KS. Hemin activation of an inducible isoform of nitric oxide synthase in vascular smooth-muscle cells. J Neurosurg 1995;83 : 862-6.

55. Stewart AG, Grigoriadis G. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide. Microsurgery 1994;15 : 693-702.

56. Broudy VC, Kaushansky K, Segal GM, Harlan JM. Tumor necrosis factor type α stimulates human endothelial cells to produce granulocyte / macrophage colony-stimulating factor. Proc Natl Acad USA 1986;83 : 7467-71.

ภาคผนวก

1. EMJH medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ Leptospira ในขนาด 1 มิลลิลิตร

ประกอบด้วย albumin fatty acid supplement 100 มิลลิลิตร และ basal medium 900 มิลลิลิตร

1.1 Stock albumin fatty acid supplement

$CaCl_2 \bullet 2H_2O + MgCl_2 \bullet 6H_2O$	1.0 (each)	g /100 ml distilled water
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	0.4	g /100 ml distilled water
$CuSO_4 \bullet 5H_2O$	0.3	g /100 ml distilled water
Vitamin B12	0.02	g /100 ml distilled water
Tween 80	10.0	g /100 ml distilled water

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง เก็บที่ 4°C

1.2 stock basal medium

Na-pyruvate	10.0	g /100 ml distilled water
Glycerol	10.0	g /100 ml distilled water

ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง และเก็บที่ 4°C

1.3 albumin fatty acid supplement

เตรียมโดยละลาย bovine serum albumin fraction V 10 g ในน้ำกลั่น 50 ml และค่อยๆ เติม stock solutions ต่อไปนี้

$CaCl_2 \bullet 2H_2O + MgCl_2 \bullet 6H_2O$	1.0	ml
$ZnSO_4 \bullet 7H_2O$	1.0	ml
$CuSO_4 \bullet 5H_2O$	0.1	ml
Vitamin B12	1.0	ml
Tween 80	12.5	ml

เติมน้ำกลั่นจนครบ 100 ml ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 1N NaOH และทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง

1.4 basal medium

เตรียมโดยชั่ง EMJH medium base 2.3 g ละลายในน้ำกลั่น 900 ml และเติม stock solutions ต่อไปนี้

Na-pyruvate	1.0	ml
Glycerol	1.0	ml

ปรับ pH เป็น 7.4 ด้วย 1N HCl และทำให้ปราศจากเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C 20 นาที

1.5 EMJH medium

ผสม albumin fatty acid supplement 1 ส่วน ใน basal medium 9 ส่วน เขย่าเบาๆ ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำโดยวิธีการปราศจากเชื้อ

2. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

PBS ในขนาด 1000 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบ

NaCl (MW 58.44; 138 mM)	8.065	g
KCl (MW 74.55; 2.7 mM)	0.200	g
Na_2HPO_4 (MW 142.0; 8 mM)	1.150	g
KH_2PO_4 (MW 136.1; 1.46 mM)	0.200	g

เติมน้ำกลั่นให้ครอบ 1 ลิตร และปรับ pH เป็น 7.4 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน 0.2 μM filter และเก็บในตู้เย็น 4°C

การเตรียมสาร สำหรับทำการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

1 **การเตรียม** Acrylamide solution (30% T, 2.7% C)

- น้ำกลั่น 120.0 มิลลิลิตร
- Acrylamide 58.4 กรัม
- N, N'-methylene-bisacrylamide 1.6 กรัม
- ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ megnetic stirrer
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายด้วย กระดาษกรอง Whatman No. 1
- ปรับ pH เป็น 7.0
- เทสารละลายไว้ในขวบทึบแสง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2 **การเตรียม** Separating gel buffer (1.5 M Tris-HCl pH 8.8)

- น้ำกลัน 160.0 มิลลิลิตร
- Trizma-base 36.3 กรัม
- ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ megnetic stirrer
- ปรับ pH ให้ได้ 8.8 โดยใช้ conc. HCl
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200.0 มิลลิลิตร
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3 **การเตรียม** Stacking gel buffer (0.5 M Tris-HCl pH 6.8)

- น้ำกลัน 40.0 มิลลิลิตร
- Trizma-base 3.0 กรัม
- ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ megnetic stirrer
- ปรับ pH ให้ได้ 6.8 โดยใช้ conc. HCl
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 50.0 มิลลิลิตร
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4 **การเตรียม** 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

- น้ำกลัน 90.0 มิลลิลิตร
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) 3.0 กรัม
- ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ megnetic stirrer ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส
- ปรับ pH ให้ได้ 7.2 โดยใช้ conc. HCl
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100.0 มิลลิลิตร

5 **การเตรียม** 10% Ammonium persulphate

- น้ำกลัน 500.0 ไมโครลิตร
- Ammonium persulphate 50.0 มิลลิกรัม
- ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ mixer

หมายเหตุ Ammonium persulphate ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

6 การเตรียม Sample solubilized buffer (2X) (0.125 M Tris-HCl pH 8.8, 4% SDS, 20%glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)

- Separating gel buffer 5.0 มิลลิลิตร
- 10% SDS 1.0 มิลลิลิตร
- Glycerol 2.0 มิลลิลิตร
- 2-mercaptoethanol 1.0 มิลลิลิตร
- Bromophenol blue 2.0 มิลลิกรัม
- ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ mixer
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 10.0 มิลลิลิตร
- ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วแบ่งใส่ microcentrifuge tube หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7 **การเตรียม** Tank buffer (0.025M Tris pH 8.3, 0.192 M glycine, 0.1% SDS)

- น้ำกลัน 900.0 มิลลิลิตร
- Trizma-base 3.0 กรัม
- Glycine 14.4 กรัม
- 10% SDS 10.0 มิลลิลิตร
- ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ megnetic stirrer

- ปรับ pH ให้ได้ 8.3 โดยใช้ conc. HCl
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000.0 มิลลิลิตร
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8 **การเตรียม** Staining solution (0.125% Coomassie blue R 250, 50% methanol, 10% acetic acid)

- น้ำกลั่น 100.0 มิลลิลิตร
- 1% Coomassie blue 62.5 มิลลิลิตร
- Methanol 250.0 มิลลิลิตร
- Acetic acid 50.0 มิลลิลิตร
- ผสมสารละลายให้เข้ากัน
- เติมน้ำกลั่นให้ครบ 500.0 มิลลิลิตร

9 **การเตรียม** Destaining solution I (50% methanol, 10% acetic acid)

- น้ำกลั่น 400.0 มิลลิลิตร
- Methanol 500.0 มิลลิลิตร
- Acetic acid 100.0 มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากัน

10 **การเตรียม**Destaining solution II (5% methanol, 7% acetic acid)

- น้ำกลั่น 800.0 มิลลิลิตร
- Methanol 50.0 มิลลิลิตร
- Acetic acid 70.0 มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000.0 มิลลิลิตร

การเตรียมแผ่น SDS-PAGE

การเตรียมแผ่นเจล SDS-PAGE สำหรับการแยกหาโปรทีน จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน โดยที่ separating gel จะต้องเตรียมก่อน เพราะอยู่ส่วนล่างของแผ่นเจล และเป็นเจลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า ส่วน stacking gel เป็นเจลที่อยู่ ส่วนบนของแผ่นเจล เป็นเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ

1. การเตรียม separating gel เพื่อใช้แยกโปรทีนออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของ ขนาดโมเลกุล และขึ้นกับเปอร์เซนต์ของเจลที่เตรียม ถ้าเปอร์เซนต์สูงจะแยกโปรทีนที่มีขนาดเล็กได้ดี กว่าเจลที่มีเปอร์เซนต์ต่ำ เพราะเจลจะมี pore size เล็กกว่า ทำให้โปรทีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ จะติดอยู่

2. Stacking gel ใช้เพื่อให้โปรทีนมาสะสมรวมกัน ให้มีความเข้มข้นของแถบโปรทีนก่อนจะไปแยกใน separating gel

1. การเตรียม 12% separating gel (10 มิลลิลิตร)

- น้ำกลั่น	3.296	มิลลิลิตร
- 30%Acrylamide solution	4.0	มิลลิลิตร
- Separating gel buffer (1.5 M Tris-HCl pH 8.8)	2.5	มิลลิลิตร
- 10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
- 10% Ammonium persulphate	0.1	มิลลิลิตร
- TEMED	0.004	มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากัน		

2. การเตรียม 5% stacking gel (4 มิลลิลิตร)

- น้ำกลั่น	2.246	มิลลิลิตร
- 30%Acrylamide solution	0.67	มิลลิลิตร
- Separating gel buffer (1.5 M Tris-HCl pH 8.8)	1.0	มิลลิลิตร
- 10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
- 10% Ammonium persulphate	0.04	มิลลิลิตร
- TEMED	0.004	มิลลิลิตร
- ผสมให้เข้ากัน		

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางนงนุช ถาวร เกิดเมื่อวันที่ 16 ตุลาคม 2508 จังหวัด กรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ปีการศึกษา 2534 ทำงานที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่ พ.ศ. 2532 จนถึงปัจจุบัน