

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยใช้ medium EMJH ซึ่งเตรียมขึ้นเอง มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณเชื้อ ซึ่งตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นมืด (darkfield microscope) แสดงลักษณะเซลล์เชื้อ *Leptospira* ที่เป็นลักษณะเฉพาะ แต่ไม่สามารถแยกสายพันธุ์จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะต้องใช้วิธีการตรวจทาง serology ที่เรียกว่า MAT (microscopic agglutination test) อย่างไรก็ตามเชื้อ *Leptospira* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้รับการยืนยันด้วยวิธีการตรวจดังกล่าวโดยห้องปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์และสาธารณสุข ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขแล้ว

Outer membrane ของ *Leptospira* สายพันธุ์ที่ก่อโรค โดยปกติแล้วจะประกอบด้วย lipopolysaccharide (LPS), glycolipid และ lipoproteins ซึ่งเป็น endotoxin และเป็นเป้าหมายหลักของระบบภูมิคุ้มกัน ส่วน *Leptospira* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคจะไม่มี endotoxin-like components ในวิธีการสกัด outer membrane protein (OMP) ที่ใช้ในการศึกษานี้ใช้ 0.4% sodium dodecyl sulfate มีขั้นตอนการทำหลายขั้นตอน และต้องใช้ระยะเวลาในการสกัดแต่ละครั้ง 2-3 วัน จึงจะได้ OMP extract ชนิดแห้ง ส่วนประกอบใน OMP extract คาดหมายว่าจะมีโปรตีนหลายชนิดที่แสดงถึง virulence ของเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 20-119 kDa แต่จากผลการทดลองการศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนผนังชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira* ในการทำ SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) ใช้ protein markers ซึ่งมี molecular weight 20-119 kDa และหยอดลงบน gel 0.2 mg/ml แต่ปริมาณของโปรตีนของเชื้อที่หยอดลงบน gel นั้น จะมีโปรตีนของเชื้อ *L.bratislava* เท่ากับ 0.128 mg/ml *Leptospira icterohaemorrhagiae* เท่ากับ 0.143 mg/ml และ *L.patoc* เท่ากับ 0.128 mg/ml และโปรตีนผนังชั้นนอกที่สกัดได้ยังเป็น crude extract จึงประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด ถึงแม้ว่า OMP ของ *Leptospira bratislava* เท่ากับ 0.248 mg/ml แต่ไม่ใช่โปรตีนชนิดเดียว แต่ละชนิดมีปริมาณน้อยมาก เป็นผลให้มองไม่เห็นแถบของโปรตีน ส่วน *Leptospira icterohaemorrhagiae* และ *L.patoc* มีโปรตีนน้อย จึงมองไม่เห็นแถบของโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับ yield ที่ได้ต่ำมาก

จากการวัดปริมาณโปรตีนของ outer membrane จะเห็นว่า โปรตีนของ outer membrane ของเชื้อ *Leptospira bratislava* มีค่าสูงสุด รองลงมาคือโปรตีนของ outer membrane ของเชื้อ *Leptospira icterohaemorrhagiae* ส่วนโปรตีนของ outer membrane ของเชื้อ *Leptospira patoc* มีค่าต่ำสุด

การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Cultured human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) พบว่า สามารถแยก endothelial cell ซึ่งตรวจยืนยันได้ด้วย ABC method และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

จากผลการศึกษาผลของ outer membrane protein extract ของ *Leptospira* ใน HUVEC พบว่า *Leptospira icterohaemorrhagiae* ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง สามารถกระตุ้น HUVEC ให้สร้าง nitric oxide ได้มากกว่า ได้มากกว่า *Leptospira* สายพันธุ์อื่นทุกความเข้มข้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 12 ชั่วโมง HUVEC จะสร้าง nitric oxide ได้สูงสุด ผลการทดลองยืนยันว่า outer membrane protein extract สามารถกระตุ้น endothelial cell ให้สร้าง nitric oxide ได้ nitric oxide มีฤทธิ์เป็น vasodilator ทำให้เกิด oxidative injury อย่างมาก⁽⁵⁵⁾ ส่วนเชื้อ *Leptospira bratislava* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรงแต่ผลการทดลองไม่สามารถกระตุ้น HUVEC ให้สร้าง nitric oxide ได้สูงขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Leptospira patoc* อาจเนื่องจากส่วนประกอบของโปรตีนใน outer membrane สูญเสียโปรตีนที่สัมพันธ์กับ virulence ของเชื้อ ส่วน LPS ซึ่งเป็น positive control ไม่สามารถกระตุ้น HUVEC ให้สร้าง nitric oxide อาจเนื่องจากความเข้มข้นของ LPS ที่ใช้ในการทดลองไม่เพียงพอที่จะออกฤทธิ์กระตุ้น endothelial cell ได้ มีรายงานการใช้ LPS ตั้งแต่ 1-10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้น endothelial cell ให้สร้าง mediators เช่น interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrotic factor- α (TNF- α)⁽⁵⁶⁾

จากผลการศึกษาผลของ outer membrane protein extract ของ *Leptospira* ต่อ HUVEC ในการสร้าง TNF- α ซึ่งเป็น proinflammatory cytokine พบว่า *Leptospira* ทุกสายพันธุ์ และทุกความเข้มข้นของโปรตีน ตลอดจน LPS ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถกระตุ้น HUVEC ให้สร้าง TNF- α ได้มากกว่า negative control ผลการทดลองใน negative control ซึ่งเป็นเพียง medium ให้ผลผิดความคาดหมาย ซึ่งไม่สามารถอธิบายถึงความผิดพลาดนี้

สรุปผลการทดลอง

การสกัด outer membrane protein ของเชื้อ *Leptospira bratislava*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* และ *Leptospira patoc* โดย solvent 0.4% sodium dodesyl sulphate และขั้นตอนที่ใช้ อาจไม่เหมาะสมสำหรับการสกัด outer membrane protein เนื่องจาก yield ที่ได้ต่ำมาก ต้องใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อเป็นจำนวนมาก และ outer membrane protein extract ที่ได้ ยังมีส่วนประกอบที่ไม่มีโปรตีนที่สัมพันธ์กับ virulence ของเชื้อ ถึงแม้ว่าเชื้อ *Leptospira icterohaemorrhagiae* จะกระตุ้นการสร้าง nitric oxide ใน endothelial cell ก็ตาม และการวิเคราะห์ปริมาณ nitric oxide และ TNF- α ต้องทำพร้อมกันในครั้งเดียว เนื่องจากใช้ assay kit ซึ่งสามารถวิเคราะห์จำนวนตัวอย่างได้จำกัด ไม่สามารถทำการวิเคราะห์นาร่องเพื่อปรับวิธีการทดลองให้เหมาะสมได้ หากจะทำการศึกษาต่อไป ควรพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (in house assay) และต้องปรับปรุงวิธีการสกัด outer membrane protein แล้วตรวจด้วย SDS-PAGE ยืนยันว่ามีส่วนประกอบของโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สัมพันธ์กับ virulence ของเชื้อ *Leptospira* ก่อนนำมาทดลองกับ HUVEC

จากผลการศึกษาการสร้าง nitric oxide ไม่สามารถแสดงถึงการกระตุ้น endothelial cell โดยเชื้อ *Leptospira* ได้อย่างชัดเจน จึงไม่สามารถศึกษาการแสดงออก (expression) ของ nitric oxide synthase (NOS) ใน HUVEC ได้ จากรายงานการศึกษาต่างๆ^(9,25) เป็นที่แน่ชัดว่ากลไกการเกิดพยาธิสภาพในโรค leptospirosis เกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune response) ซึ่งอาศัยเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นหลัก ส่วน endothelial cell อาจมีบทบาทอยู่บ้างในการเกิดพยาธิสภาพในโรค leptospirosis โดยอาจมีปฏิกริยาร่วมกับเซลล์เม็ดเลือดขาว