

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira*

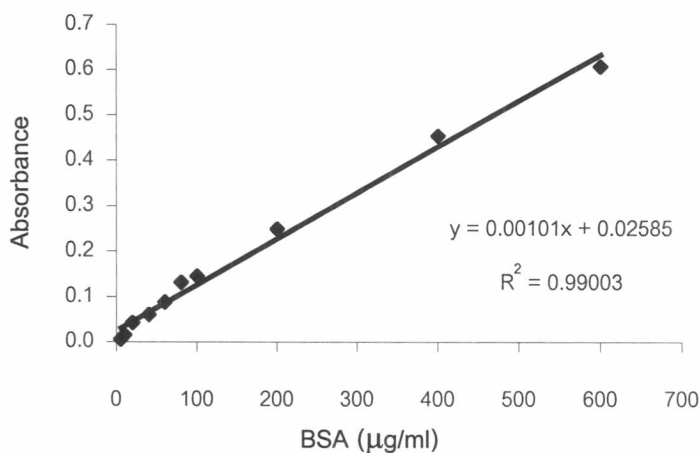
การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Leptospira* วิธีการข้างต้น⁽¹⁷⁾ พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ดี ลักษณะของเชื้อที่ดูภายใต้ darkfield microscope พบว่ามีลักษณะรูปร่างเป็นเกลียว (coiled) ขนาดเล็ก ปลายทั้งสองข้างหรือข้างใดข้างหนึ่งจะโค้งหรืองอเป็นตะขอ (hook) เคลื่อนไหวตลอดเวลาด้วยการหมุนรอบแกนยาว

2. การสกัด outer membrane protein (OMP)

วิธีการสกัด OMP ของเชื้อ *Leptospira* โดยใช้ 0.4% sodium dodecyl sulfate และผ่านขั้นตอนต่างๆ จนได้ lyophilize powder มีลักษณะเป็นผงเบาสีขาวเหมือนปุยฝ้าย

3. การวัดปริมาณโปรตีนของ outer membrane

Standard curve ของ bovine serum albumin มีลักษณะเป็นเส้นตรงในความเข้มข้น ตั้งแต่ 100 – 600 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงใน รูปที่ 10 วัดค่าโปรตีนของ OMP ที่แยกได้จากเชื้อ *Leptospira* 3 สายพันธุ์ ทำการวัดซ้ำ 3 ครั้ง แสดงไว้ในตารางที่ 2



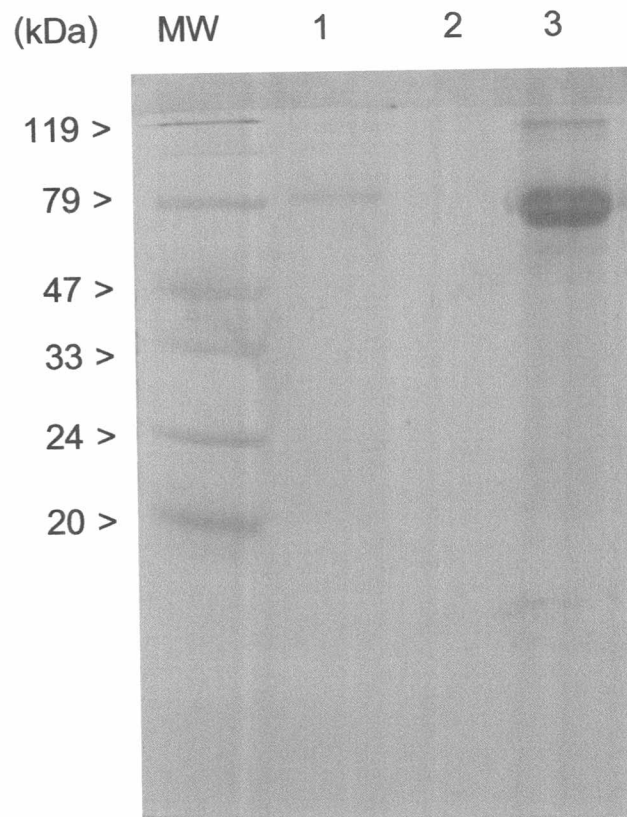
รูปที่ 10 Standard curve ของ bovine serum albumin (BSA) ค่า absorbance วัดที่ wavelength 600 nm

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนของ OMP ของเชื้อ *Leptospira bratislava*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* และ *Leptospira patoc*

Serovar	Protein content ($\mu\text{g/ml}$)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
<i>L.bratislava</i>	246	264	234	248
<i>L.icterohaemorrhagiae</i>	159	148	123	143
<i>L.patoc</i>	142	121	121	128

นำค่าเฉลี่ยโปรตีนที่วัดได้ไปคำนวณความเข้มข้นสำหรับใช้ในการทดสอบกับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยง (HUVEC)

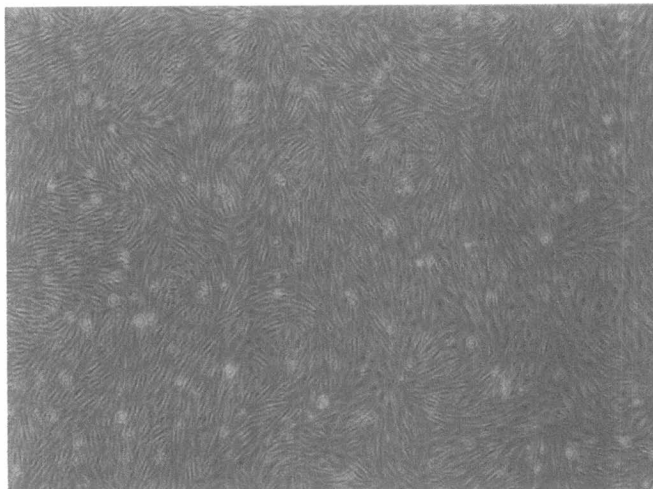
4. การศึกษาองค์ประกอบของโปรตีนผนังชั้นนอกของเชื้อ *Leptospira* โดยใช้ SDS-PAGE
(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)



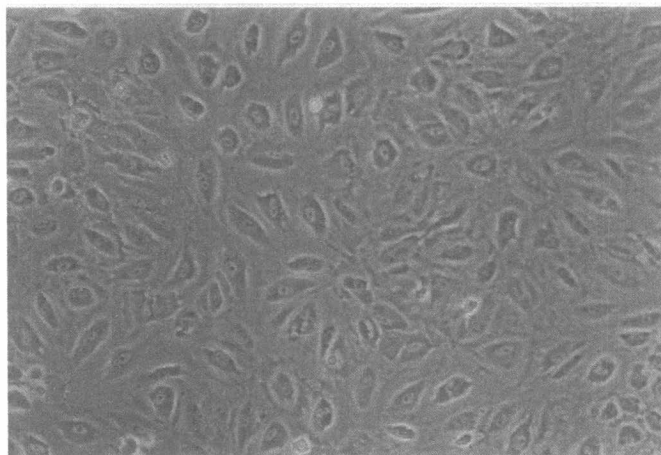
รูปที่ 11 ผลของการทำ SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบองค์ประกอบของ OMP Lane MW เป็น molecular weight standard, Lane 1; *L. patoc*, Lane 2; *L. icterohaemorrhagiae*, Lane 3; *L. bratislava*.

5. การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผนังหลอดเลือด (Cultured human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)

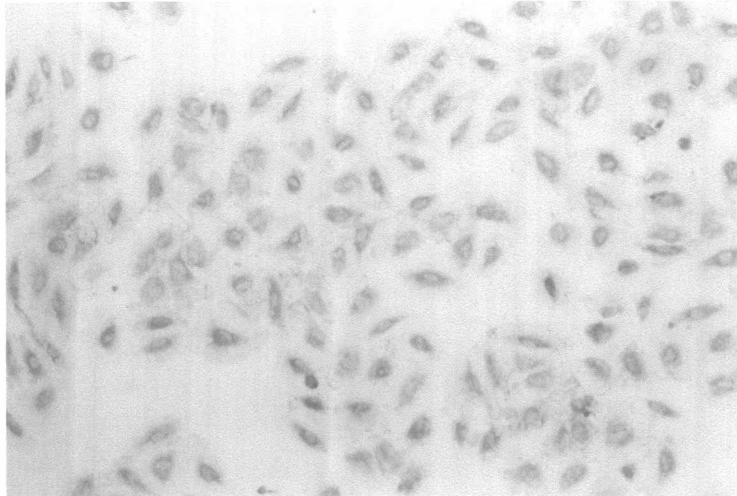
เซลล์บุผนังหลอดเลือดที่เพาะเลี้ยงตามวิธีข้างต้น มีลักษณะเป็นเซลล์เรียงตัวชั้นเดียว รูปร่างเรียวยาว (spindle) รูปที่ 12-13 และการตรวจด้วย ABC method แสดงผลยืนยันว่าเป็น endothelial cell ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 12 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) ที่เพาะเลี้ยง อายุ 7 วัน (กำลังขยาย x 100)



รูปที่ 13 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) ที่เพาะเลี้ยง อายุ 7 วัน (กำลังขยาย x 200)



รูปที่ 14 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) ที่ตรวจด้วย ABC method

6. ศึกษาผลของ outer membrane protein extract ของ *Leptospira* ใน HUVEC

ได้ทดลองศึกษาผลของ OMP ของเชื้อ *Leptospira* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในความเข้มข้น 1, 3, 5 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ HUVEC ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า HUVEC ตายในทุกการทดลอง ทั้งนี้ตรวจ cell viability โดยวิธี MTT

ผลการทดลอง OMP ของเชื้อ *Leptospira* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ต่อ HUVEC ในเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ *Leptospira* ทั้ง 3 สายพันธุ์ในความเข้มข้นและระยะเวลาที่ศึกษา ไม่มีผลทำให้เซลล์ตาย

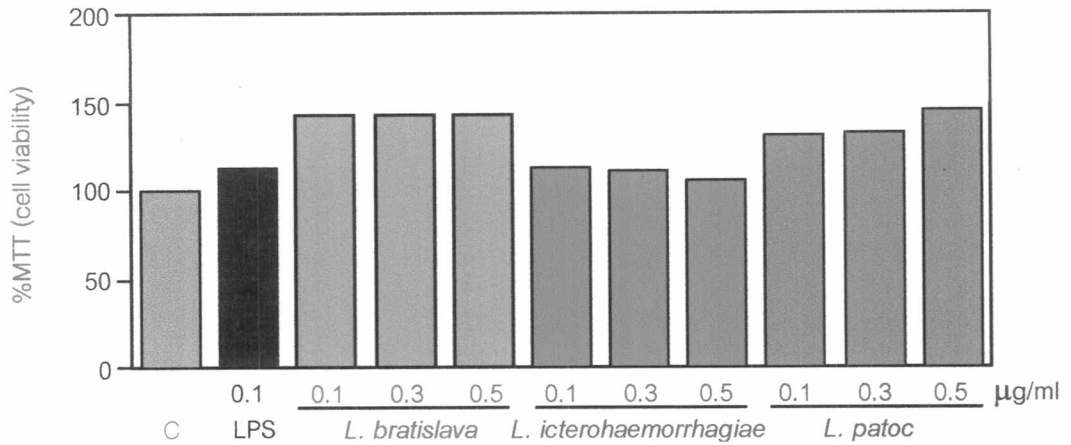
ตารางที่ 3 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (ข้อมูลเปรียบเทียบกับ control (mean \pm SE))

เวลา (ชั่วโมง)	LPS 0.1 μ g/ml	OMP of <i>L.bratislava</i> (μ g/ml)			OMP of <i>L.icterohaemorrhagiae</i> (μ g/ml)			OMP of <i>L.patoc</i> (μ g/ml)		
		0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5
6	113.08 \pm 3.26	142.31 \pm .26	142.31 \pm 27.20	142.31 \pm 11.97	112.31 \pm 17.41	110.77 \pm 13.05	105.38 \pm 7.61	130.77 \pm 0.00	133.08 \pm 7.61	145.38 \pm 16.32
12	106.15 \pm 8.28	110.77 \pm 7.61	123.08 \pm 12.39	133.85 \pm 15.09	193.85 + 64.40	110.77 \pm 11.54	112.31 \pm 10.67	112.31 \pm 10.67	113.85 \pm 4.88	143.08 \pm 10.82
24	104.48 \pm 3.17	120.90 \pm 17.27	117.91 \pm 14.33	120.90 \pm 23.09	104.48 \pm 17.31	107.46 \pm 16.09	104.48 \pm 12.32	114.93 \pm 5.56	113.43 \pm 22.81	108.96 \pm 21.31

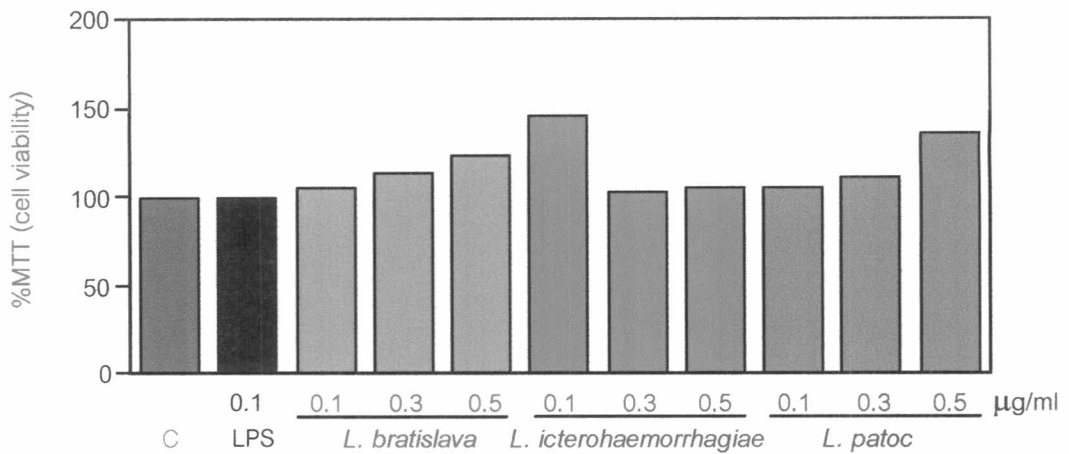
HUVEC = Human umbilical vein endothelial cell

LPS = Lipopolysaccharide

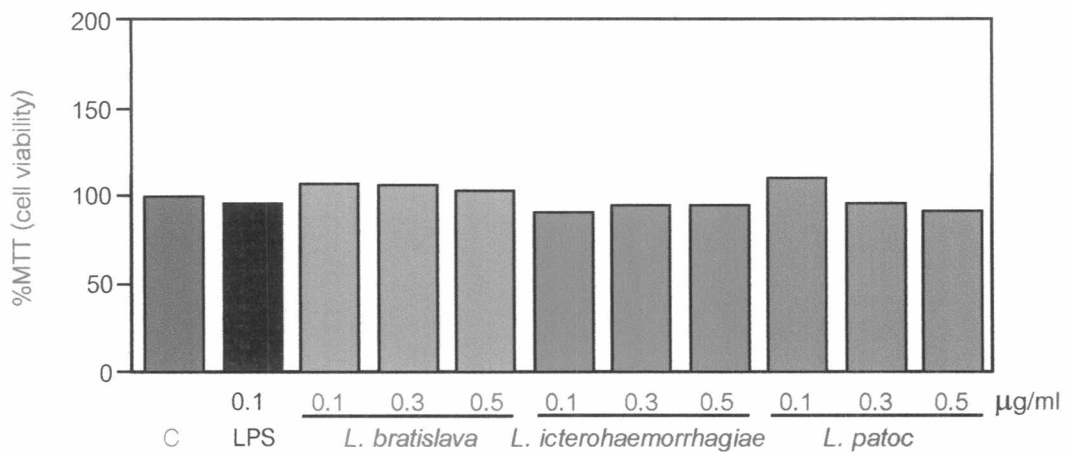
OMP = Outer membrane protein



รูปที่ 15 กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6 ชั่วโมง



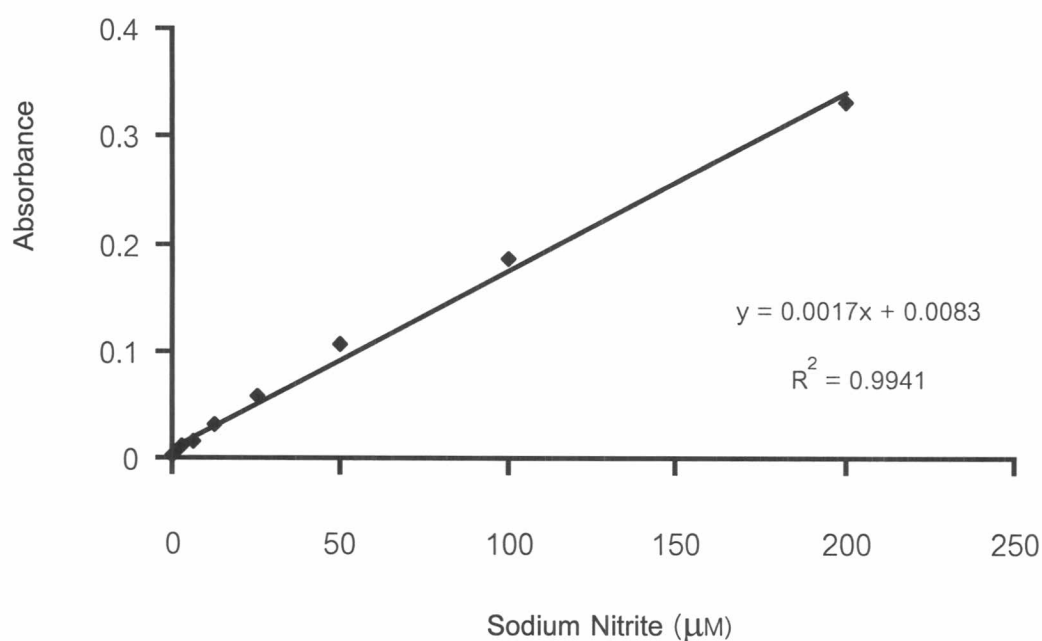
รูปที่ 16 กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 17 กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ cell viability ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง

8. การวัดปริมาณ nitric oxide

ผลการทดลอง OMP ของเชื้อ *Leptospira* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับอย่างกว้างขวางว่าเป็นการวัดปริมาณการสร้าง nitric oxide ผลการทดลอง แสดงไว้ในตารางที่ 4 และรูปที่ 19 ถึงรูปที่ 21



รูปที่ 18 Standard curve ของการวัดปริมาณ NaNO_3

ตารางที่ 4 การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite (ข้อมูลเปรียบเทียบกับ control (mean \pm SE))

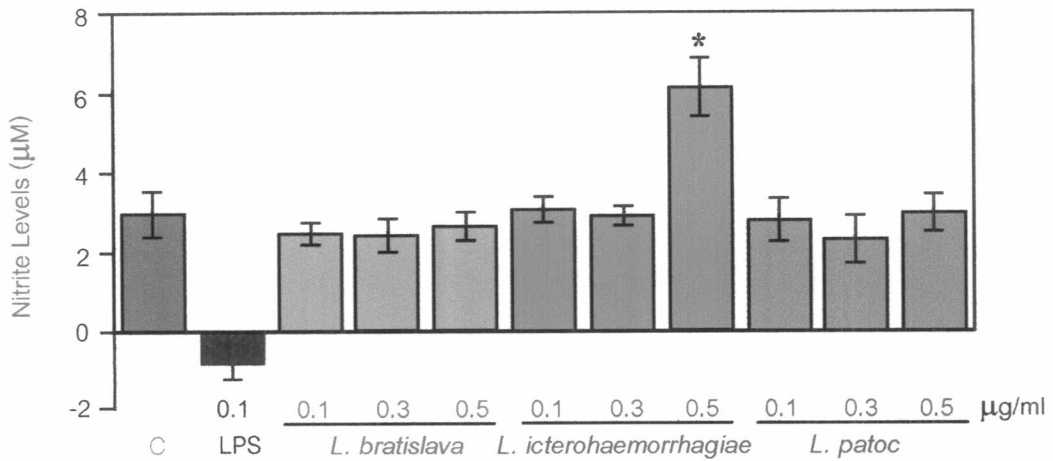
เวลา (ชั่วโมง)	Control	LPS ($\mu\text{g/ml}$) 0.1	OMP of <i>L.bratislava</i> ($\mu\text{g/ml}$)			OMP of <i>L.icterohaemorrhagiae</i> ($\mu\text{g/ml}$)			OMP of <i>L.patpc</i> ($\mu\text{g/ml}$)		
			0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5
6	2.867 \pm 0.964	-0.800 \pm 0.482	2.422 \pm 0.482	2.330 \pm 0.686	2.552 \pm 0.589	2.996 \pm 0.54	2.848 \pm 0.417	6.033* \pm 1.256	2.737 \pm 0.934	2.237 \pm 7.61	2.867 \pm 16.32
12	3.237 \pm 3.	-0.596 \pm 8.28	2.978 \pm 7.61	3.422 \pm 12.39	3.145 \pm 15.09	3.422 \pm 64.40	3.237 \pm 11.54	5.700* \pm 10.67	3.015 \pm 10.67	2.978 \pm 4.88	2.830 \pm 10.82
24	2.515 \pm 3.	-0.874 \pm 3.17	3.422 \pm 17.27	3.034 \pm 14.33	2.978 \pm 23.09	3.070 \pm 17.31	3.219 \pm 16.09	5.756* \pm 12.32	2.885 \pm 5.56	3.237 \pm 22.81	3.385 \pm 21.31

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับ control ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

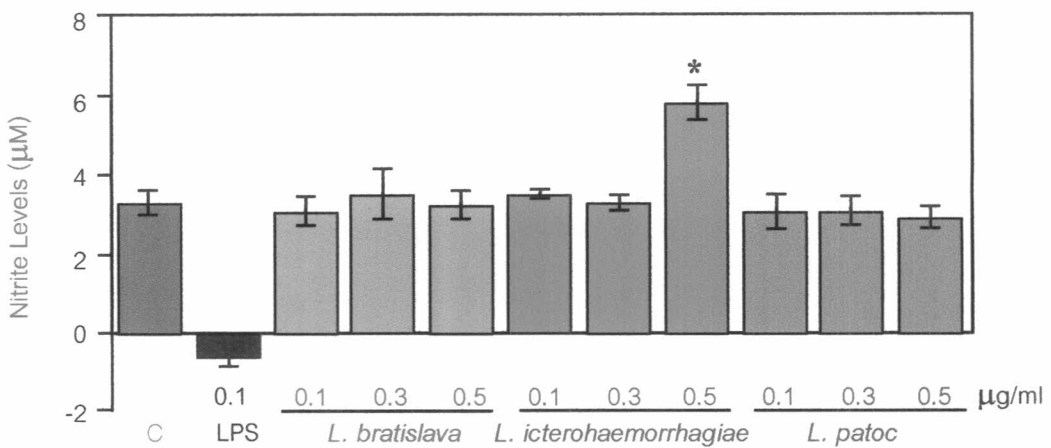
HUVEC = Human umbilical vein endothelial cell

LPS = Lipopolysaccharide

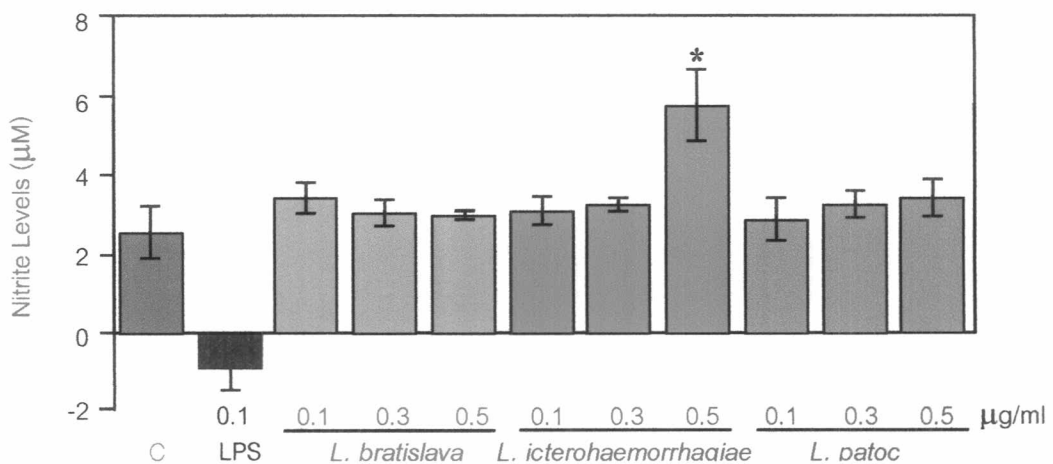
OMP = Outer membrane protein



รูปที่ 19 การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite



รูปที่ 20 การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 12 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite



รูปที่ 21 การสร้าง nitric oxide โดย HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง ใช้วิธีการวัด nitrite

9. การวัดปริมาณ TNF- α

ผลการทดลอง OMP ของเชื้อ *Leptospira* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการสร้าง TNF- α โดย HUVEC ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5 และภาพที่ 22 ถึงภาพที่ 24

ตารางที่ 5 แสดงผล TNF- α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง (ข้อมูลเปรียบเทียบกับ control (mean \pm SE))

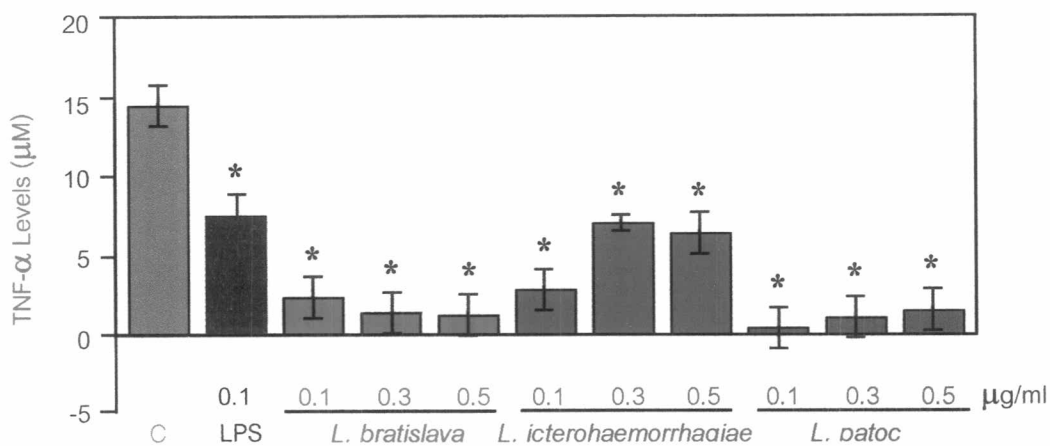
เวลา (ชั่วโมง)	Control	LPS (μ g/ml)	OMP of <i>L.bratislava</i> (μ g/ml)			OMP of <i>L.icterohaemorrhagiae</i> (μ g/ml)			OMP of <i>L.patpc</i> (μ g/ml)		
			0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5	0.1	0.3	0.5
6	14.646 \pm 1.049.	7.555* \pm 0.690	2.237* \pm 0.769	1.250* \pm 0.509	1.050* \pm 0.460	2.710* \pm 0.081	6.930* \pm 0.693	6.343* \pm 0.203	0.315* \pm 0.825	0.925* \pm 0.475	1.370* \pm 0.250
12	14.646 \pm 1.049	-0.583* \pm 0.107	0.197* \pm 0.544	-0.500* \pm 0.208	0.097* \pm 0.790	-0.033* \pm 0.150	-0.327* \pm 0.139	0.425* \pm 0.805	-0.085* \pm 0.205	2.978* \pm 0.357	2.530* \pm 2.070
24	14.646 \pm 1.049	7.555* \pm 0.690	-0.233* \pm 0.263	0.497* \pm 0.387	-0.520* \pm 0.343	-0.293* \pm 0.788	-1.013* \pm 0.058	-0.530* \pm 0.345	-0.225* \pm 0.845	-0.340* \pm 0.500	0.460* \pm 0.780

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบกับ control ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

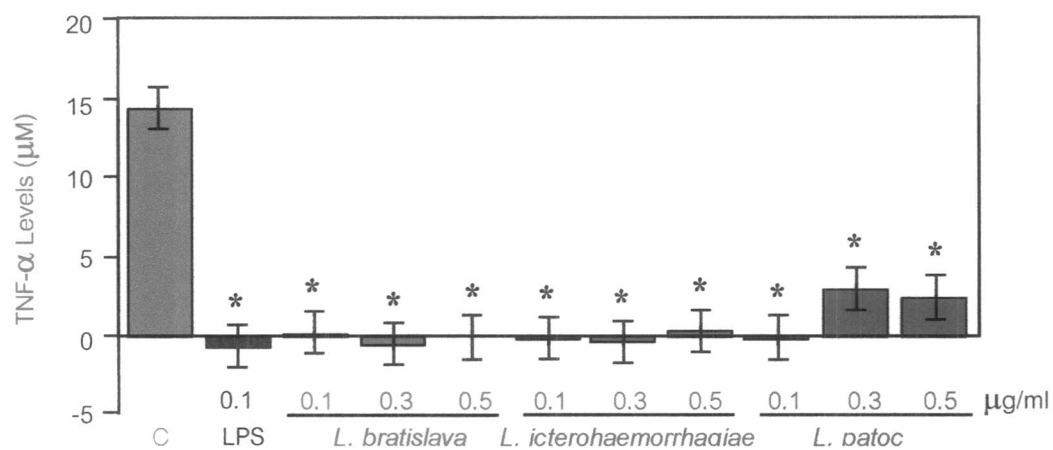
HUVEC = Human umbilical vein endothelial cell

LPS = Lipopolysaccharide

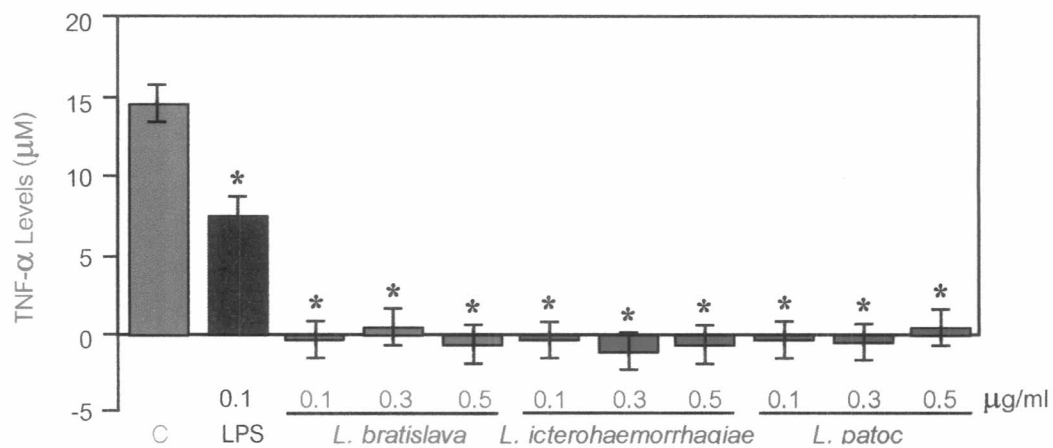
OMP = Outer membrane protein



รูปที่ 22 กราฟแสดงผล TNF- α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 6 ชั่วโมง



รูปที่ 23 กราฟแสดงผล TNF- α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 24 กราฟแสดงผล TNF- α ของ HUVEC ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS และ OMP ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในเวลา 24 ชั่วโมง