บทที่ 5

การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ต่อการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า

เมื่อประกอบระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้าแล้ว จะนำเครื่องหลอมเซลล์ไปทดสอบการหลอมเซลล์ ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญที่จะทำให้เครื่องมีความสมบูรณ์ตามวัตถุประสงค์ คือ องค์ประกอบที่ใช้ในการหลอมเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ และปัจจัยทางไฟฟ้าต่อการหลอมเซลล์ โดยศึกษาในรายละเอียดดังต่อไปนี้

- ผลของความเข้มข้นของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์(Fusion solution) เพื่อดูผลของแรงดันออสโมติก(Osmotic pressure) ของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยไฟฟ้า

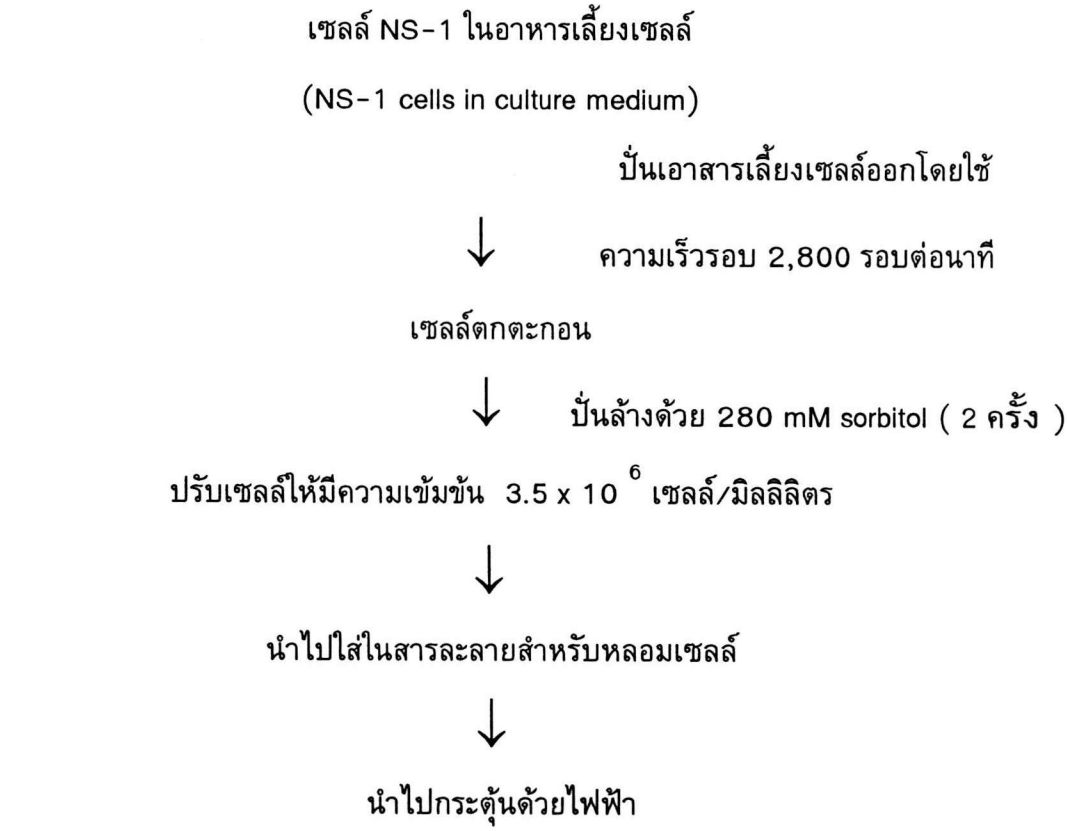
- ผลของอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ เมื่อใช้อิออน 1 ชนิด หรือ 2 ชนิดรวมกัน ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ โดยอิออนศึกษาได้แก่ แคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน

- ผลของไฟฟ้ากระแสสลับ (AC sine wave) ที่ใช้ในการเรียงตัวของเซลล์ โดยศึกษาผลของความถี่ และแรงดันของสัญญาณที่ให้แก่เซลล์

- ผลของสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์ โดยศึกษาผลของจำนวนพัลส์ ความกว้างพัลส์ และแรงดันของสัญญาณที่ให้แก่เซลล์

เนื่องจากการทดสอบการหลอมเซลล์ที่ถูกต้องมีความจำเป็นที่จะต้องพิสูจน์ว่าเซลล์ลูกผสมที่เกิดขึ้นเช่น เซลล์ไฮบริโดมา มีสมบัติและลักษณะเดิมของพ่อแม่หรือไม่ ประกอบกับปัจจุบันการหลอมเซลล์เพื่อผลิตโมโนโคนัลแอนติบอดีส่วนมากจะใช้เซลล์หนู mouse กันอย่างแพร่หลาย การอาศัยระบบนี้เพื่อการประเมินประสิทธิภาพการหลอมเซลล์ของเครื่องที่ประดิษฐ์น่าจะเป็นวิธีสะดวกที่สุด ดังนั้นการหลอมเซลล์ในงานวิจัยนี้จะใช้เซลล์ของหนูเป็นเซลล์ตัวอย่าง โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ต่อการหลอมเซลล์ เพื่อกำหนดภาวะที่เหมาะสมในการที่จะนำมาใช้

ในการหลอมเซลล์ และในงานวิจัยนี้จะใช้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดชนิดพสามาจากหนู (NS-1 cell) เป็นเซลล์ตัวอย่าง มีขั้นตอนการเตรียมเซลล์แสดงในรูปที่ 5.1



รูปที่ 5.1 ขั้นตอนการเตรียมเซลล์มะเร็งของหนู

จากรูปที่ 5.1 นำเซลล์ NS-1 มาปั่นเอาสารเลี้ยงเซลล์ออก และทำการปั่นล้างอีกครั้งด้วยสารละลายน้ำตาลซอร์บิทอลที่มีภาวะเป็นไอโซออสโมลาร์สำหรับเซลล์ NS-1 [Foung *et al*, 1990] และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 3.5 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร นำเซลล์ไปแขวนลอยในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ หลังจากนั้นนำเซลล์ไปกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์และสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ ในระหว่างการกระตุ้นให้เซลล์มาเรียงและหลอมรวมกันได้ทำการบันทึกภาพของเซลล์ที่อยู่ในห้องบรรจุเซลล์ลงบนแถบวิดิทัศน์เพื่อนำภาพของเซลล์มาฉายซ้ำและนับจำนวนเซลล์หลอมกับเซลล์แตกจากจอโทรทัศน์ โดยคำนวณผลที่ได้ดังนี้

การคำนวณ

เปอร์เซ็นต์เซลล์หลอม (% Cell fusion)

$$= \frac{\text{จำนวนเซลล์หลอม} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

เปอร์เซ็นต์เซลล์แตก (%Cell break)

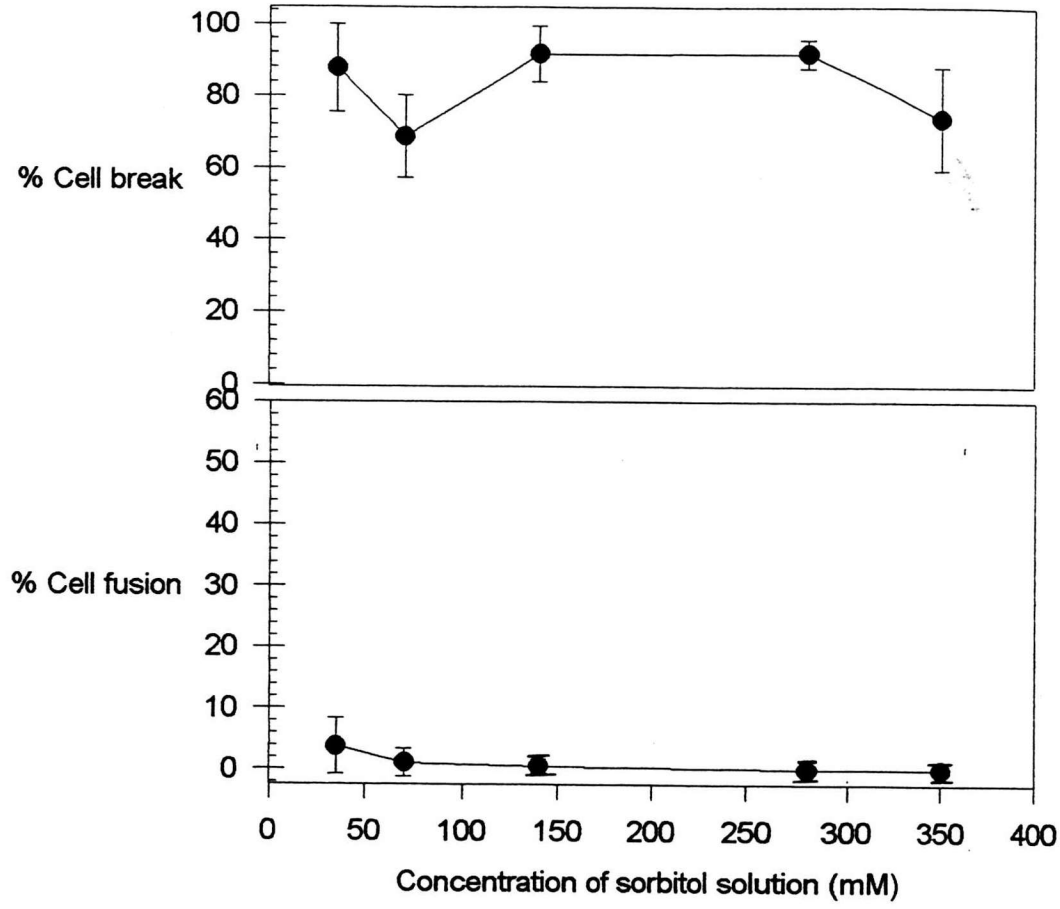
$$= \frac{[(\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}) - (\text{จำนวนเซลล์หลอม}+\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่หลอม})] \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}$$

สำหรับการศึกษาปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ เริ่มต้นศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลซอร์บิทอล และศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นอิออนต่อการหลอมเซลล์ โดยใช้ปัจจัยทางไฟฟ้าที่ภาวะเดียวกันคือใช้สัญญานคลื่นรูปไซน์แรงดัน 30 V, ความถี่ 1 MHz ทำให้เซลล์มาเรียงตัวกัน และใช้สัญญาณคลื่นรูปพัลส์จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างของพัลส์เป็น 10 μs/พัลส์ มีขนาดแรงดันเป็น 300 V ทำให้เซลล์มาหลอมรวมกัน โดยมีระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดของห้องบรรจุเซลล์เป็น 2 mm

ปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

1. การศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์(Fusion solution)

ในการทดลองนี้ได้ใช้สารละลายซอร์บิทอล เป็นสารละลายสำหรับหลอมเซลล์โดยได้ทำการแปรความเข้มข้นของซอร์บิทอล ตั้งแต่ 35- 350 mM โดยใช้ความเข้มข้นที่เป็นภาวะไอโซออสโมลาร์(Iso-osmolar) คือ 280 mM ภาวะไฮโปออสโมลาร์(Hypo-osmolar) อยู่ในช่วง 35- 140 mM และ ไฮเปอร์ออสโมลาร์คือ 350 mM ได้ผลการทดลองแสดงในกราฟรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 ผลของความเข้นข้นของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ในการหลอมเซลล์ NS-1

ข้อสังเกต : ในสารละลายซอร์บิทอล 35 mM เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายจะแตกเองก่อนทำการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า โดยมีเซลล์แตกประมาณ 90 % หลังจากแขวนลอยเซลล์ในสารละลายซอร์บิทอล 35 mM เป็นเวลา 15 นาที ส่วนในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM จะมีเซลล์แตกประมาณ 40 %

จากผลการทดลองรูปที่ 5.2 จะเห็นได้ว่าการหลอมเซลล์ NS-1 ในสารละลายซอร์บิทอลที่ไม่ใส่อิออนจะมีเปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมสูงประมาณ 4 % ที่ความเข้มข้น 35 mM และ 1.05 % ที่ความเข้มข้น 70 mM และเปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ

สารละลายซอร์บิทอลเพิ่มขึ้นจนถึง 140 mM และไม่มีเซลล์หลอมกันเมื่อใช้สารละลายซอร์บิทอลที่ความเข้มข้นในช่วง 280 - 350 mM

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในรูปที่ 5.2 เซลล์จะหลอมกันเมื่อใช้สารละลายที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 280 mM พบว่าเซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายที่เป็นไฮโปออสโมลาร์ (hypo-osmolar) จะหลอมกันได้ดีกว่าเมื่อแขวนลอยเซลล์ในสารละลายที่เป็นไอโซออสโมลาร์ ซึ่งจากรายงานของ Daumler และ Zimmermann ในปี 1989 สันนิษฐานไว้ว่าเซลล์ที่แขวนลอยในภาวะไฮโปออสโมลาร์ เซลล์เมมเบรนจะมีแรงตึงผิวเพิ่มขึ้นเป็นผลให้โปรตีนที่เป็นโครงสร้างของเมมเบรน(Membrane skeleton protein) และโปรตีนที่เป็นโครงสร้างเซลล์(Cell skeleton protein) มีการเคลื่อนที่และแยกออกจากกัน จากผลที่เกิดขึ้นนี้จะทำเซลล์เมมเบรนยอมให้สารผ่านเข้าออกได้เพิ่มขึ้น โอกาสที่เซลล์หลอมรวมกันจึงมีมากขึ้น

ในการกระตุ้นเซลล์ให้มาหลอมกันด้วยไฟฟ้า จะมีเซลล์บางส่วนแตกไปจากการศึกษาผลความเข้มข้นของสารละลายซอร์บิทอลต่อการแตกของเซลล์ในรูปที่ 5.2 พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์แตกจะสูงมากคืออยู่ในช่วง 70-90 %

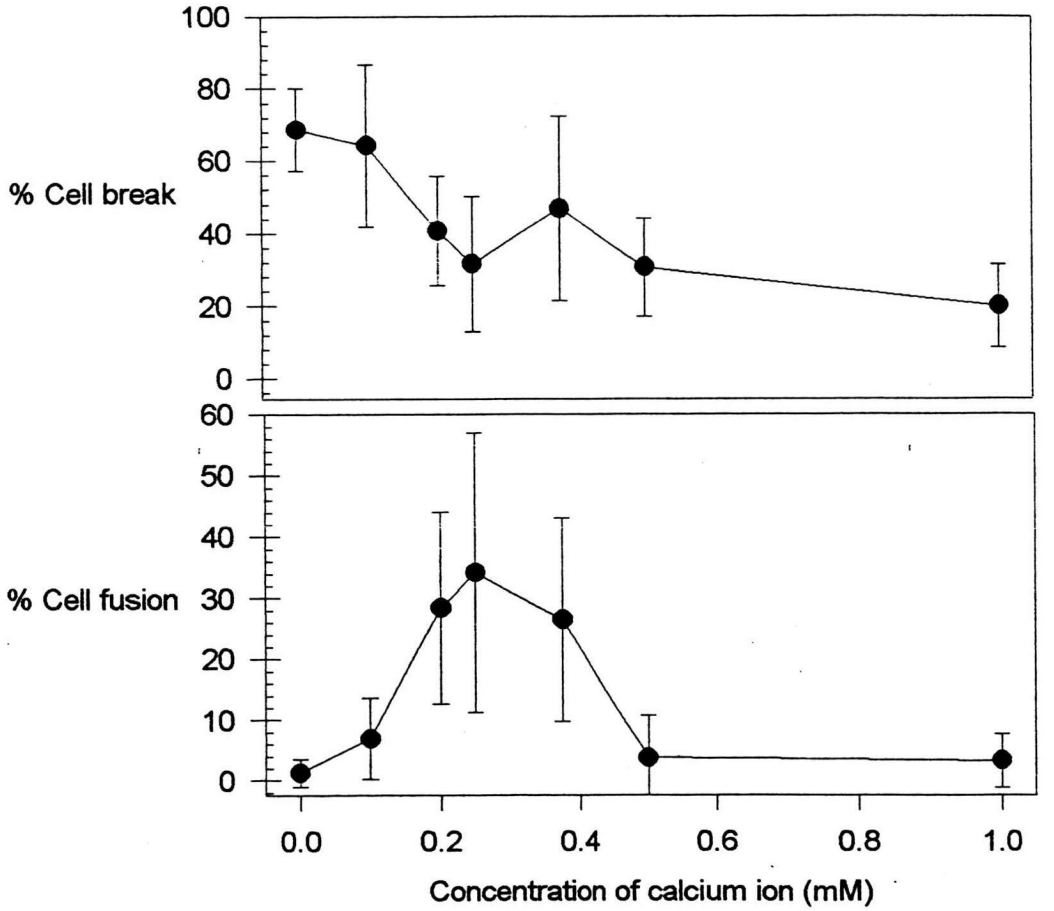
จากการทดลองในรูปที่ 5.2 พอสรุปได้ว่าเซลล์ที่แขวนอยู่ในภาวะไฮโปออสโมลาร์ คือสารละลายซอร์บิทอล 70 mM สามารถทำให้เซลล์มาหลอมรวมกันได้ประมาณ 1 % ซึ่งจากการศึกษาของ Foung และ คณะ ในปี 1990 ได้ศึกษาการหลอมเซลล์ ไฮบริโดมา (Mouse-human heteromyeloma และ Mouse hybridoma) ในสารละลายซอร์บิทอลที่เป็นภาวะไฮโปออสโมลาร์(75 mM) จะให้ผลการหลอมเซลล์ดีกว่าภาวะไอโซออสโมลาร์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงได้กำหนดความเข้มข้นของสารละลายซอร์บิทอล 70 mM เป็นสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

จากผลการทดลองในรูปที่ 5.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้สารละลายสำหรับหลอมเซลล์จะที่ไม่ผสมอิออน มีเปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์มีเพียง 0-4% และมีเปอร์เซ็นต์การแตกถึง 70-90% อย่างไรก็ตามได้เลือกสารละลายซอร์บิทอล 70 mM เป็นสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ การทดลองในขั้นต่อไปได้ศึกษาอิทธิพลของอิออน โดยแยกเป็นการศึกษาแคลเซียมและแมกนีเซียมอิออนเพียงชนิดเดียว(ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.3 และ 5.4) หลังจากนั้นจึง

ผสมอิออนทั้งสองชนิดลงไปในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ (ผลการทดลองในรูปที่ 5.5 และ 5.6)โดยใช้แมกนีเซียมอะซีเตท($MgC_4H_6O_4.H_2O$)และแคลเซียมอะซีเตท($CaC_4H_6O_4.H_2O$) เป็นแหล่งอิออน

2. การศึกษาผลของแคลเซียมอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

ในการศึกษาผลของแคลเซียมอิออนได้แปรความเข้มข้นของอิออน ตั้งแต่ 0-1 mM ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ โดยใช้ปัจจัยทางไฟฟ้าเพื่อการกระตุ้นเซลล์เช่นเดียวกับการศึกษาปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ในหัวข้อที่ 1 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.3



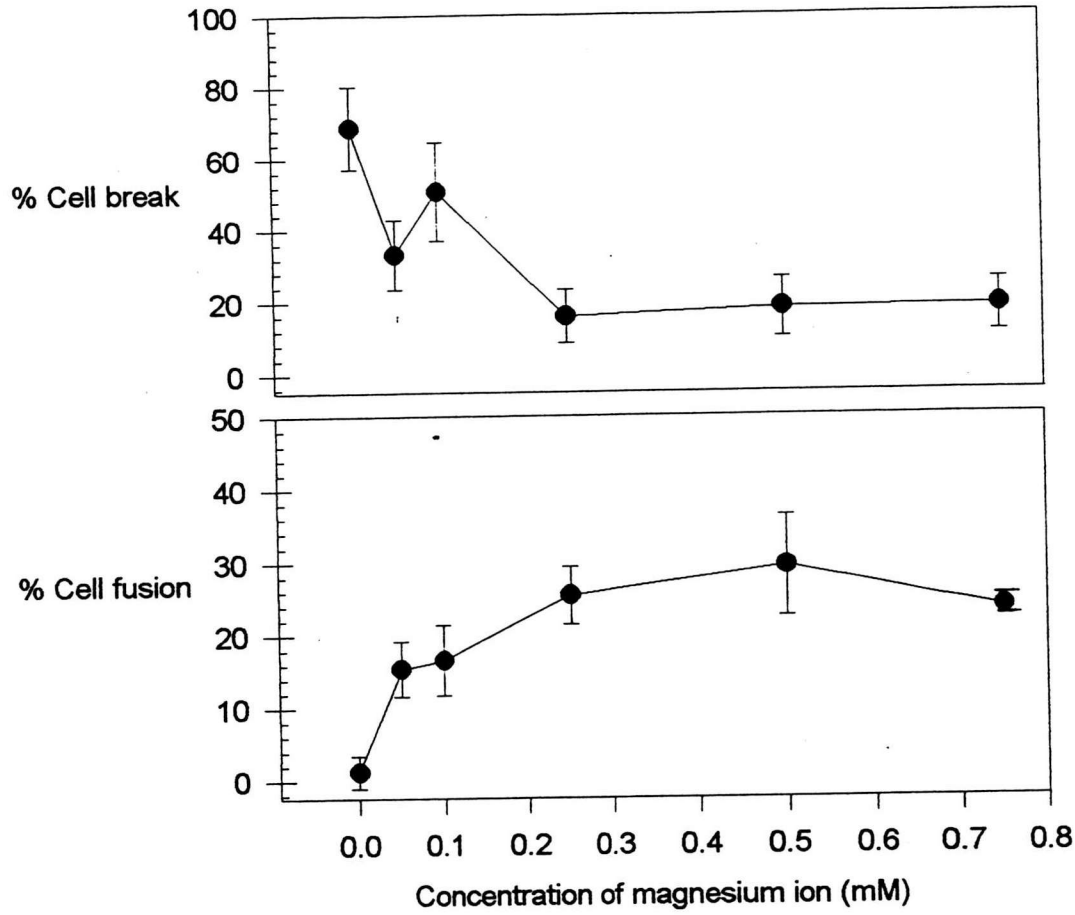
รูปที่ 5.3 ผลของแคลเซียมอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

จากรูปที่ 5.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อใส่อิออนของแคลเซียมเพิ่มลงไปในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM แคลเซียมอิออนจะช่วยให้เซลล์เข้ามาหลอมกันมากขึ้นและช่วยเซลล์แตกน้อยลง โดยมีความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0.25 mM จะให้เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์สูงสุดประมาณ 34 % และเปอร์เซ็นต์การแตกของเซลล์ลดลงเหลือเพียงประมาณ 20% นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเปอร์เซ็นต์การแตกของเซลล์มีแนวโน้มลดลงเมื่อในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์มีแคลเซียมอิออนมากขึ้น

จากการทดลองในรูปที่ 5.3 จะเห็นได้ว่าแคลเซียมอิออนช่วยให้เซลล์หลอมกัน ได้ดีขึ้นและช่วยให้เซลล์แตกน้อยลง เมื่อแขวนลอยเซลล์ในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM ที่มีแคลเซียมอิออน 0.25 mM

3. การศึกษาผลของแมกนีเซียมอิออนในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM

ในการศึกษาผลของแมกนีเซียมอิออนได้แปรความเข้มข้นของอิออนตั้งแต่ 0-0.75 mM โดยใช้แมกนีเซียมอะซีเตทเป็นแหล่งของแมกนีเซียมอิออน โดยใช้ปัจจัยทางไฟฟ้าเพื่อการกระตุ้นเซลล์เช่นเดียวกับการศึกษาปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ในหัวข้อที่ 1 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.4



รูปที่ 5.4 ผลของแมกนีเซียมอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

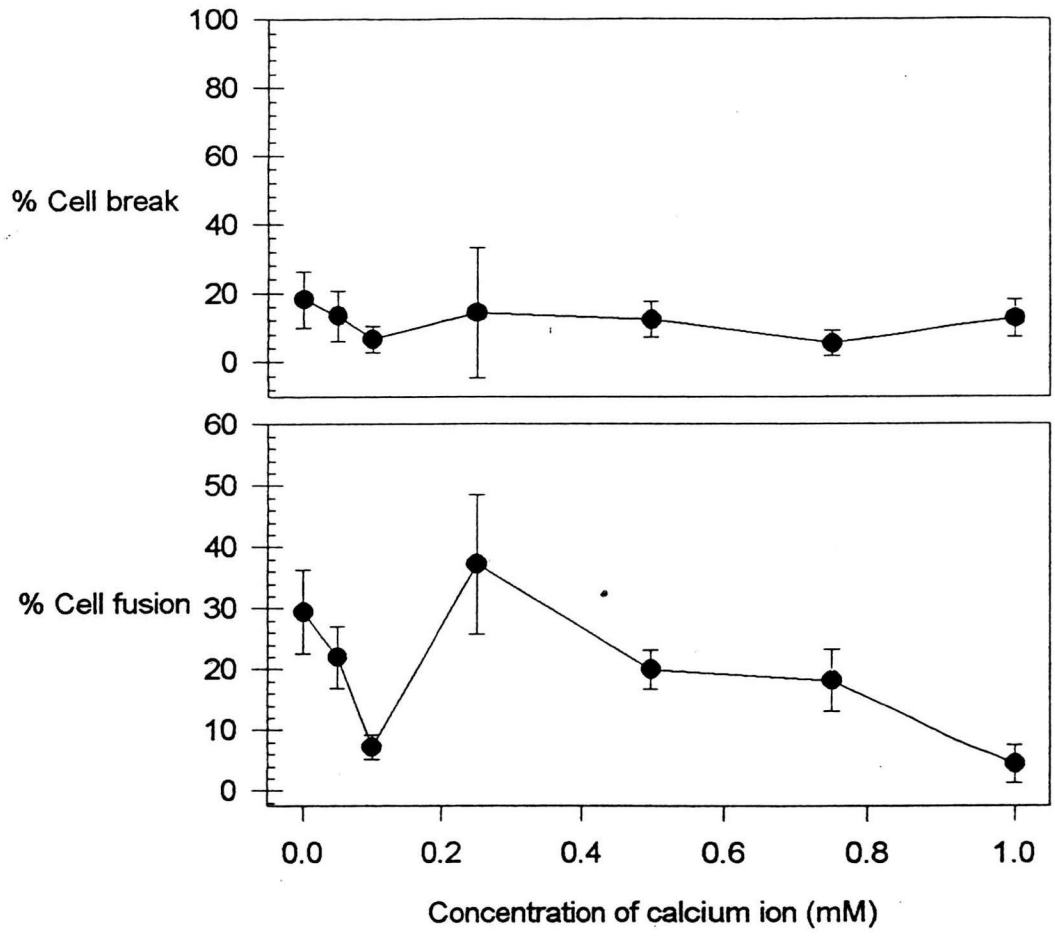
จากผลการทดลองในรูปที่ 5.4 แมกนีเซียมอิออนที่อยู่ในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM จะช่วยให้เซลล์ NS-1 มาหลอมกันมากขึ้น โดยเซลล์ที่หลอมกันนั้นจะมีมากเมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนในสารละลายมีความเข้มข้น 0.5 mM (37%) นอกจากนี้ปริมาณของแมกนีเซียมอิออนมีผลต่อการแตกของเซลล์ คือเมื่อมีปริมาณของแมกนีเซียมอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์มากขึ้นเปอร์เซ็นต์การแตกของเซลล์มีแนวโน้มลดลง

จากผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าแมกนีเซียมอิออนที่มีอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์มีผลต่อการหลอมเซลล์และการแตกของเซลล์ โดยจะช่วยให้เซลล์มาหลอมกันมากขึ้นและลดเปอร์เซ็นต์การแตกของเซลล์ ซึ่งภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนเป็น 0.5 mM

จากรูปที่ 5.3 และ 5.4 จะเห็นว่าทั้งแคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออน ที่มีอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์จะมีผลต่อการหลอมเซลล์และการแตกของเซลล์ โดยทำให้เซลล์หลอมกันได้มากขึ้นและเซลล์แตกน้อยลง นอกจากนี้ในงานวิจัยยังได้ศึกษาผลของอิออนผสม 2 ชนิด ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

4.การศึกษาผลความเข้มข้นของอิออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ที่แปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน

ในการศึกษาผลของแคลเซียมอิออน ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์มีอิออนทั้งสองชนิดอยู่รวมกัน ได้แปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนตั้งแต่ 0-1 mM โดยให้ความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนคงที่ที่ 0.5 mM โดยใช้ปัจจัยทางไฟฟ้าเพื่อการกระตุ้นเซลล์เช่นเดียวกับการศึกษาปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ในหัวข้อที่ 1 ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.5



รูปที่ 5.5 ผลความเข้มข้นของอิออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ที่แปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน

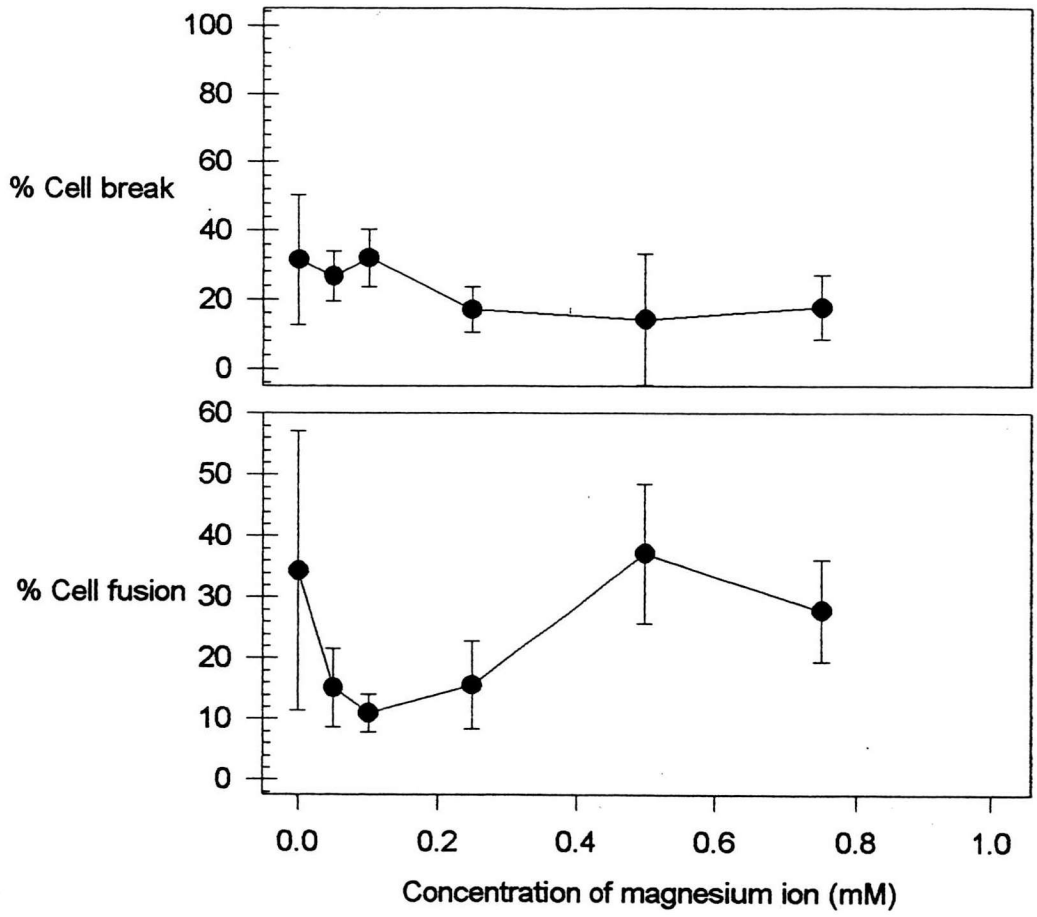
เมื่อพิจารณาในรูปที่ 5.5 แล้วจะเห็นว่าผลของแคลเซียมอิออนที่มีอยู่ในสารละลาย ซอร์บิทอล 70 mM ที่มีแมกนีเซียมอิออน 0.5 mM จะได้ผลการหลอมเซลล์ประมาณ 37 % เมื่อเติมแคลเซียมอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ 0.25 mM และถ้าปริมาณของ แคลเซียมอิออนมากกว่าหรือน้อยกว่า 0.25 mM (จนถึง 0.1 mM) เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์ ก็จะลดลง แต่ถ้าในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์มีปริมาณแคลเซียมอิออนน้อยกว่า 0.1 mM แล้ว เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์จะเพิ่มขึ้นอีกครั้ง

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้ว จะเห็นว่าปริมาณของแคลเซียมที่ทำให้เซลล์หลอมกันได้สูงสุดคือ 0.25 mM ถ้าอิออนของแคลเซียมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์มีมากกว่า 0.25

mM ปริมาณของแคลเซียมอิออนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณอิออนรวมในสารละลายมีมาก อิออนที่มีในสารละลายมากๆ นี้จะทำให้สารละลายมีการนำไฟฟ้าได้มากขึ้น และทำให้สนามไฟฟ้าที่จะกระตุ้นเซลล์มีค่าลดลง ซึ่งจะมีผลต่อเนื่องถึงการหลอมเซลล์ทำให้เซลล์หลอมรวมกันได้น้อยลงได้ ส่วนปริมาณของแคลเซียมอิออนในช่วงความเข้มข้นมากกว่า 0 จนกระทั่งเข้าใกล้ 0.25 mM เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์ลดลงนั้น ยังไม่ปรากฏหลักฐานที่แน่ชัดว่าเกิดจากสาเหตุใด

5. การศึกษาผลความเข้มข้นของอิออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ที่แปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออน

ในการศึกษาผลของอิออนผสม ได้แปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนตั้งแต่ 0-1 mM และให้ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนคงที่ 0.25 mM โดยใช้ปัจจัยทางไฟฟ้าเพื่อการกระตุ้นเซลล์เช่นเดียวกับการศึกษาปัจจัยทางชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ในหัวข้อที่ 1 ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.6



รูปที่ 5.6 ผลความเข้มข้นของอิออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ที่แปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออน

จากรูปที่ 5.6 พบว่าผลของแมกนีเซียมอิออนในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM ที่มีอิออนของแคลเซียม 0.25 mM นั้นเซลล์จะหลอมรวมกันได้ดีเมื่อมีแมกนีเซียมอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์เท่ากับ 0.5 mM และได้เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์สูงสุดประมาณ 37 % ถ้าในสารละลายมีอิออนของแมกนีเซียมมากกว่าหรือน้อยกว่า เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์จะลดลง การแตกของเซลล์จะมีค่าในช่วงประมาณ 20-30% ซึ่งปริมาณเซลล์ที่แตกนี้จะมีค่ามากกว่าในการทดลองหัวข้อ 5.5

จากรูปที่ 5.5 และ 5.6 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้อิออนสองชนิดรวมกัน โดยให้ความเข้มข้นของอิออนตัวใดตัวหนึ่งคงที่ (แมกนีเซียมเท่ากับ 0.5 mM หรือแคลเซียมเท่ากับ 0.25 mM)

ความเข้มข้นของอิออนทั้งสองชนิดที่เหมาะสมสำหรับการหลอมเซลล์ NS-1 ในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM คือ แคลเซียม 0.25 mM และแมกนีเซียม 0.5 mM หากความเข้มข้นของอิออนทั้งสองชนิดมากหรือน้อยกว่านี้ผลการหลอมรวมเซลล์จะลดลง การที่เซลล์หลอมกันได้น้อยลงเมื่อมีความเข้มอิออนในสารละลายสูงกว่านี้ เกิดจากความเข้มข้นของอิออนสูงนี้ อิออนที่อยู่ในสารละลายนี้จะไปลดสนามไฟฟ้าที่จะกระตุ้นเซลล์ได้ และถ้าความเข้มข้นของอิออนที่เติมลงไปอยู่ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 0.1 mM การที่เปอรเซ็นต์เซลล์หลอมลดลงนั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่เกิดขึ้นแน่นอน

การมีอิออนผสมในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์นั้นเปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างอย่างเด่นชัดเมื่อมีอิออนเพียงชนิดเดียว และการที่มีอิออนสองชนิดอยู่รวมกันในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์อิออนทั้งสองจะช่วยรักษาสภาพเซลล์ NS-1 ทำให้เซลล์แตกน้อยในระหว่างการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าอีกด้วย โดยเปอร์เซ็นต์การแตกของเซลล์ลดลงจากที่ไม่ใส่อิออนในสารละลายจากประมาณ 70-90% จนเหลือประมาณ 5-30 %

การที่เซลล์หลอมกันได้มากขึ้นเมื่อเติมอิออนลงในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ คาดว่าเกิดจากอิออนของแคลเซียมหรือแมกนีเซียมจะเป็นตัวช่วยให้เกิดรูที่เซลล์เมมเบรน [Vos et. al, 1976] [Gerhard et. al, 1978] และยังช่วยให้เซลล์มาเรียงติดกันได้ดีขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ [Tempelaar et. al, 1987] ซึ่งการที่เซลล์เรียงติดกันได้ดีขึ้นจะทำให้เซลล์มีโอกาสหลอมรวมกันได้สูงขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์จากที่ไม่ใส่อิออนจะมีเปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์ 4% และเมื่อใส่อิออนลงไปในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์แล้วเปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมรวมกันเพิ่มเป็น 37%

จากการศึกษาที่กล่าวมาแล้ว เป็นการศึกษาปัจจัยด้านชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ ขั้นต่อไปจะศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าต่อการหลอมเซลล์ โดยศึกษาผลของสัญญาณคลื่นรูปไซน์และสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่มีต่อการหลอมเซลล์ NS-1

ในการศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าต่อการหลอมเซลล์ ในงานวิจัยนี้ได้เลือกสารละลายแขวนลอยเซลล์ที่มีอิออนรวมอยู่ด้วย โดยเลือกกำหนดภาวะที่เซลล์หลอมกันได้ดีที่สุด(37%) คือสาร

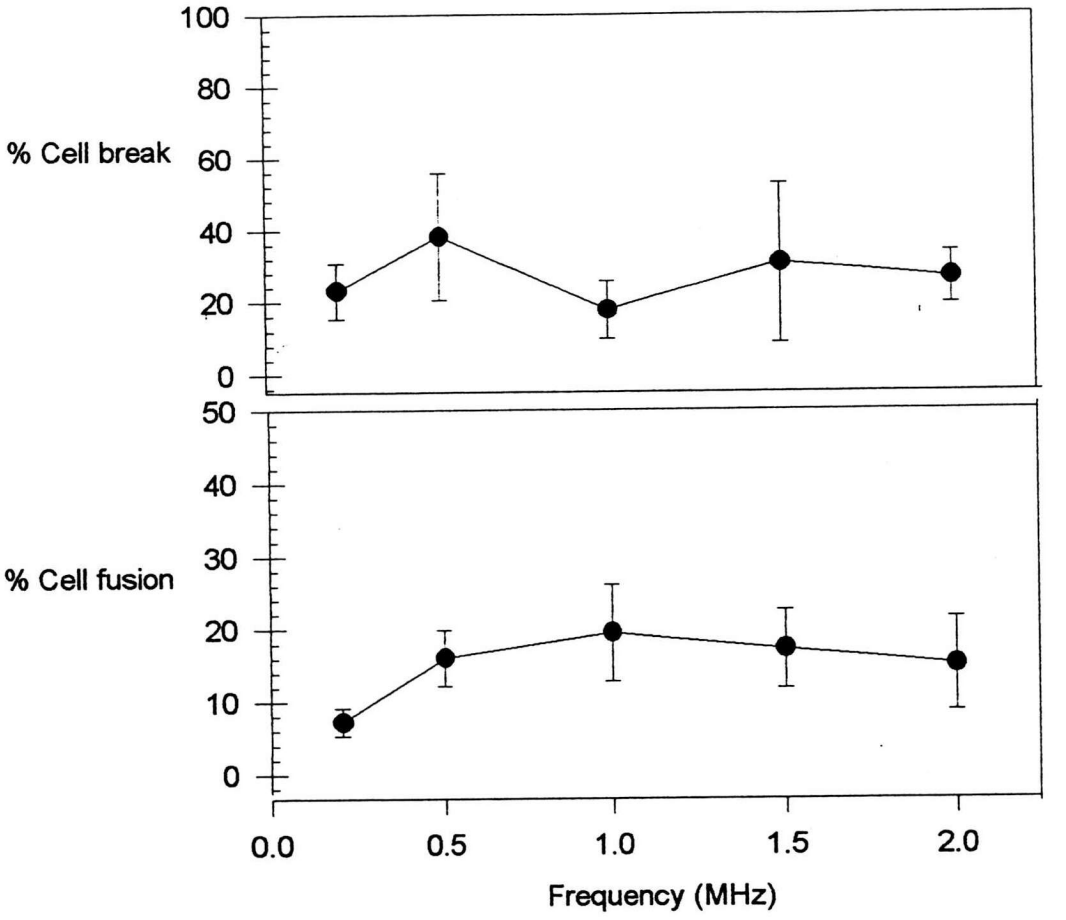
ละลายซอร์บิทอล 70 mM ที่มีแคลเซียมอิออน 0.25 mM และ แมกนีเซียมอิออน 0.5 mM เป็นสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

ปัจจัยทางไฟฟ้า

ในการศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าต่อการหลอมเซลล์ NS-1 ครั้งแรกได้ทำการศึกษาผลของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ที่ใช้ในการเรียงเซลล์ หลังจากนั้นนำผลที่ได้ไปใช้เป็นข้อกำหนดเบื้องต้นสำหรับการศึกษาผลของสัญญาณคลื่นรูปพัลส์

1. การศึกษาผลของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ต่อการหลอมเซลล์ (Alignment frequency)

การศึกษาผลของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ ที่ใช้ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของความถี่ และแรงดันที่ใช้ในการเรียงตัวของเซลล์ โดยได้เปลี่ยนความถี่ที่ใช้ในการเรียงตัวของเซลล์ตั้งแต่ 200 kHz - 2 MHz ที่แรงดัน 12 V (เครื่องกำเนิดสัญญาณคลื่นรูปไซน์สามารถสร้างค่าแรงดันสูงสุด 12 V เมื่อใช้ความถี่ 2 MHz) คลื่นสัญญาณรูปพัลส์ จำนวน 4 พัลส์ ขนาดของพัลส์ 10 μs/พัลส์ แรงดันพัลส์ 300 V ใช้สารละลายสำหรับหลอมเซลล์คือ สารละลายซอร์บิทอล 70 mM ที่มีแคลเซียมอิออน 0.25 mM และ แมกนีเซียมอิออน 0.5 mM และใช้ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างอิเล็คโทรด 2 mm ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.7



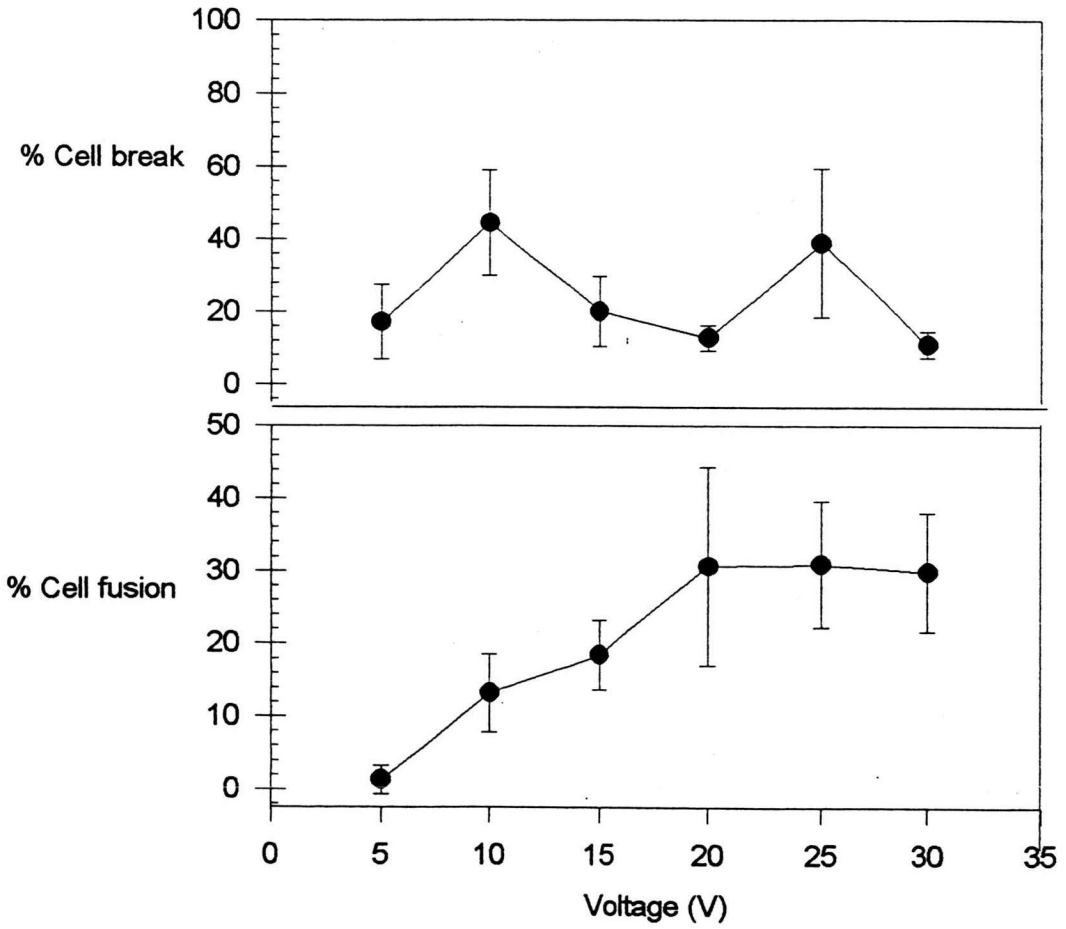
รูปที่ 5.7 ผลของความถี่ที่ใช้ในการเรียงเซลล์ต่อการหลอมเซลล์

จากการทดลองที่ 5.7 จะเห็นได้ว่าการเหนี่ยวนำให้เซลล์มาเรียงกันที่ความถี่ต่างๆ กันของคลื่นสัญญาณรูปไซน์นั้น ความถี่ที่ทำให้เซลล์หลอมรวมกันมากที่สุดคือ 1 MHz(20 %) ซึ่งผลการหลอมเซลล์ไม่แตกต่างอย่างเด่นชัดเมื่อ กระตุ้นด้วยความถี่ในช่วง 500 kHz - 2 MHz ส่วนการกระตุ้นด้วยความถี่ 200 kHz โมเลกุลที่เป็นเซลล์เมมเบรนและอิออนภายในเซลล์สามารถเคลื่อนที่ตามความถี่ได้ทันทำให้เซลล์มีการหมุนในระหว่างการหลอมเซลล์เป็นผลให้เซลล์หลอมกันได้น้อย สำหรับเปอร์เซ็นต์การแตกของเซลล์นั้นจะอยู่ในช่วงประมาณ 20 -40%

อย่างไรก็ตามในการทดลองต่อไปได้กำหนดภาวะการกระตุ้นให้เซลล์มาเรียงกันด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ โดยใช้ความถี่ 1 MHz เพื่อศึกษาผลของแรงดันของสัญญาณคลื่นรูปไซน์

2. การศึกษาผลของแรงดันที่ใช้ในการเรียงตัวของเซลล์ (Alignment voltage)

ในการศึกษาผลของแรงดัน ได้ใช้ความถี่ในการเรียงตัว 1 MHz และเปลี่ยนแรงดันที่ใช้ในการเรียงตัวของเซลล์ตั้งแต่ 5-30 V โดยสารละลายที่ใช้ในการแขวนลอยเซลล์และภาวะของการกระตุ้นคลื่นรูปพัลส์เหมือนการศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าในหัวข้อที่ 1 ซึ่งได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.8



รูปที่ 5.8 ผลของแรงดันที่ใช้ในการเรียงเซลล์ต่อการหลอมเซลล์

จากผลการทดลองในรูปที่ 5.8 จะเห็นว่าเมื่อใช้สัญญาณคลื่นรูปไซน์แรงดันต่ำกว่า 20 V เปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมที่เกิดขึ้นจะลดลง การหลอมเซลล์เกิดมากเมื่อกระตุ้นเซลล์โดยใช้แรงดันตั้งแต่ 20 ขึ้นไปจนถึง 30 V การเพิ่มแรงดันของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ให้สูงขึ้นจะส่งผลให้

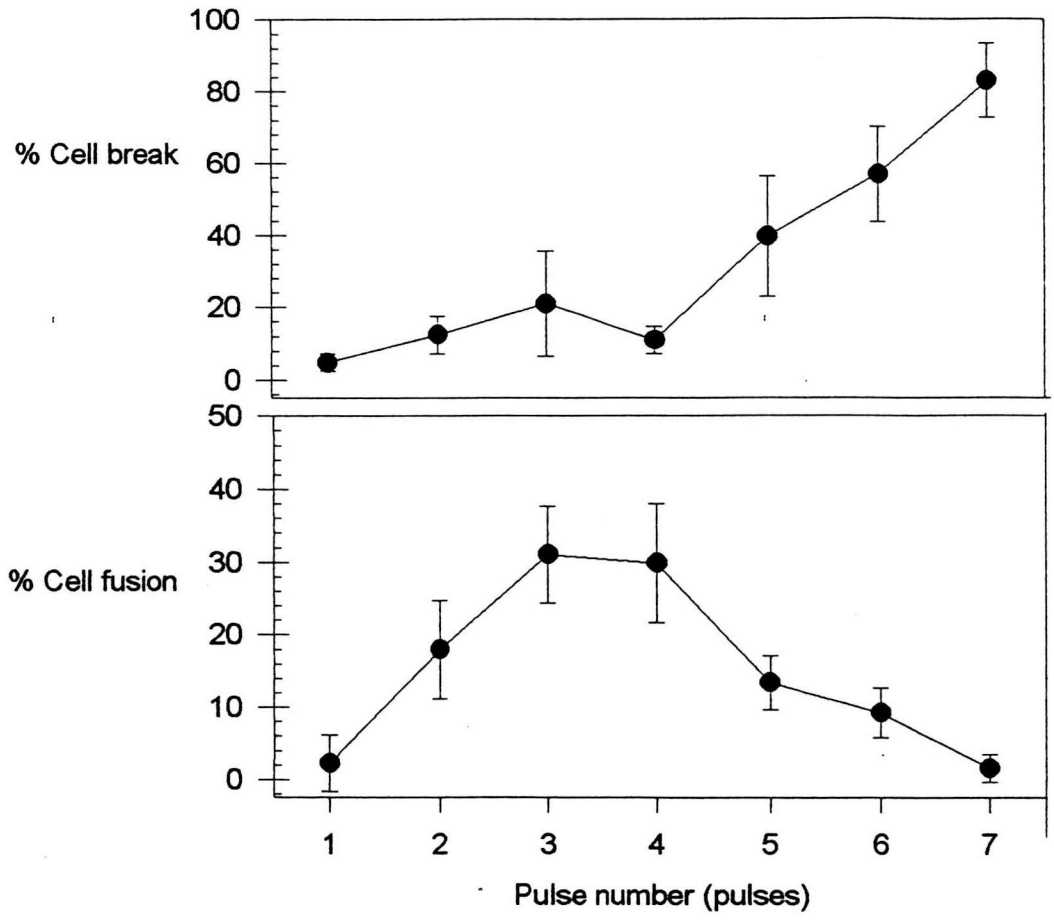
เกิดการเหนี่ยวนำประจุไฟฟ้าในเซลล์เกิดโพลาไรเซชันสูงขึ้น จึงทำให้แรงดึงดูดระหว่างเซลล์มากขึ้นโอกาสที่เซลล์จะหลอมกันจึงเพิ่มมากขึ้น

ในการทดลองต่อไปได้เลือกใช้ค่าแรงดันที่ใช้ในการเรียงตัวคือ 30 V เป็นข้อกำหนดเบื้องต้นในการศึกษาผลของคลื่นรูปพัลส์ต่อการหลอมเซลล์

ในการศึกษาผลของคลื่นรูปพัลส์ ใช้ภาวะของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ความถี่ 1 MHz แรงดัน 30 V ในการทดลองได้ศึกษาผลของจำนวนพัลส์ ความกว้างพัลส์และแรงดันของพัลส์ที่ใช้ในการกระตุ้นให้เซลล์มาหลอมรวมกัน

3. การศึกษาผลของจำนวนพัลส์ (Number of pulse)

ในการศึกษาผลของจำนวนพัลส์ต่อการหลอมเซลล์ ได้ใช้ความกว้างของพัลส์ 10 μs และแรงดันพัลส์ 300 V โดยแปรจำนวนพัลส์ ตั้งแต่ 1-7 ใช้สารละลายสำหรับหลอมเซลล์และสัญญาณคลื่นรูปไซน์เหมือนการศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าในหัวข้อที่ 1 และใช้ห้องบรรจุเซลล์ที่มีระยะห่างระหว่างอิเล็คโทรด 2 mm ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5.9

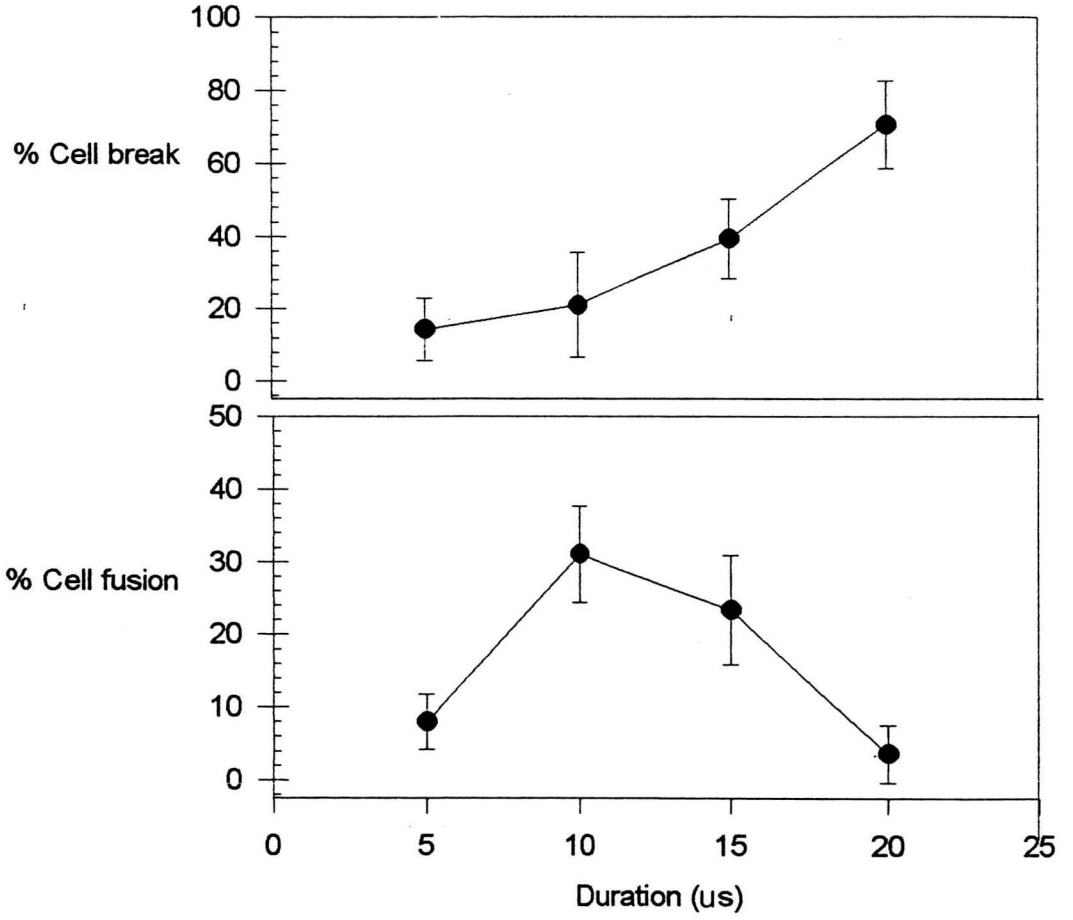


รูปที่ 5.9 ผลของจำนวนพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์

จากรูปที่ 5.9 จำนวนพัลส์ที่เหมาะสมในการหลอมเซลล์คือ 3 และ 4 พัลส์ ซึ่งจะได้เปอร์เซ็นต์การหลอมใกล้เคียงกัน เมื่อใช้จำนวนพัลส์ที่มากหรือน้อยกว่านี้เซลล์หลอมที่เกิดขึ้นจะลดลง แนวโน้มของเซลล์แตกที่เกิดขึ้นจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนพัลส์มากกว่า 4 พัลส์ การที่เซลล์แตกมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยจำนวนพัลส์ที่มากขึ้นเกิดจากจำนวนพัลส์ที่มากเกินจะทำให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้าจะมีผลต่อผิวเซลล์ที่เปลี่ยนสภาพเนื่องจากแรงทางไฟฟ้าเป็นผลให้ผิวเซลล์ที่เกิดรูแล้วไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมของเซลล์ได้ เซลล์จึงแตกมากกว่าที่เซลล์จะมาหลอมกัน ในทางกลับกันเมื่อกระตุ้นด้วยจำนวนพัลส์ที่น้อยกว่า 3 พัลส์ การกระตุ้นด้วยแรงทางไฟฟ้าจะลดลงจึงทำให้เกิดเซลล์การหลอมเซลล์น้อยตามไปด้วย

4. การศึกษาผลของความกว้างพัลส์(Pulse width) ที่ใช้ในการหลอมเซลล์

ในการศึกษาผลของความกว้างพัลส์ได้แปรความกว้างของพัลส์ตั้งแต่ 5 - 20 μs โดยใช้จำนวนพัลส์ 3 พัลส์และแรงดัน 300 V ภาวะของสัญญาณคลื่นรูปไซน์และสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ใช้เหมือนการศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าในหัวข้อที่ 1 ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5.10



รูปที่ 5.10 ผลความกว้างพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์

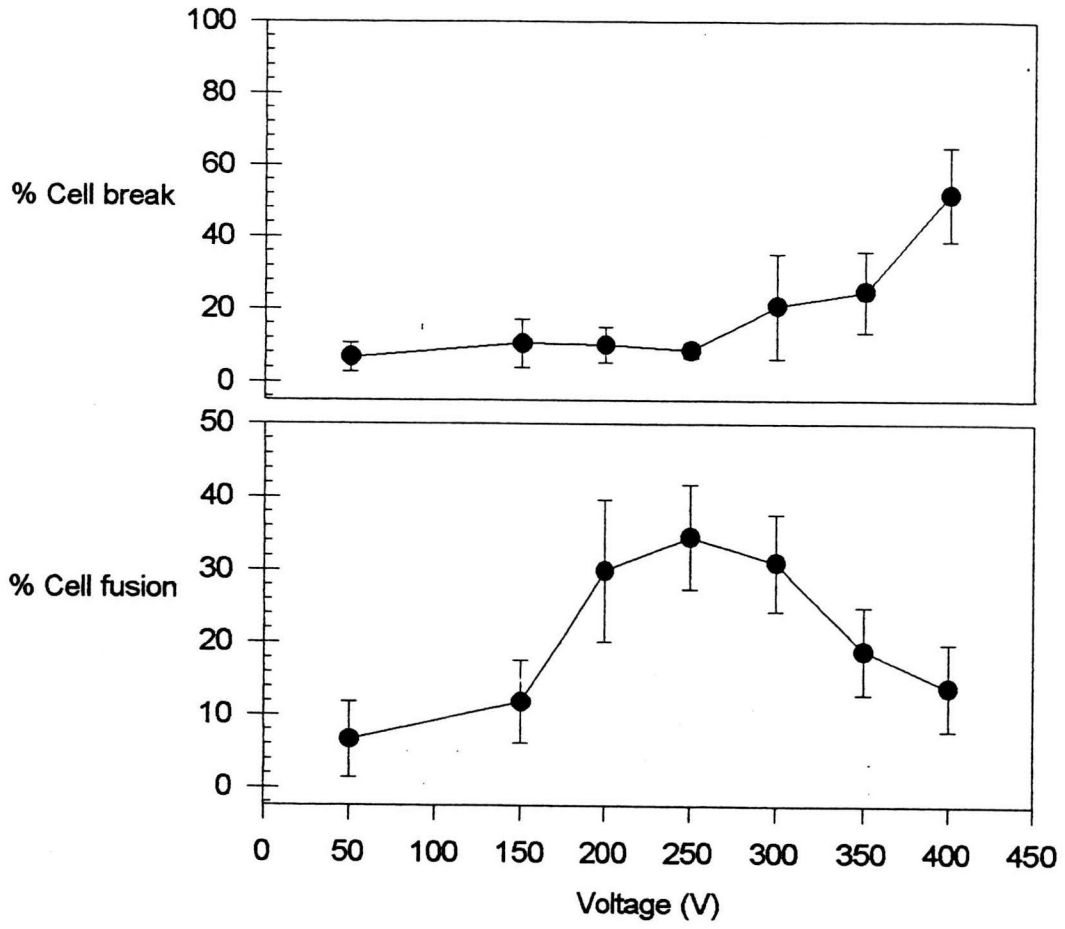
ผลการทดลองจากรูปที่ 5.10 ค่าความกว้างของสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่เหมาะสม คือ 10 μs ซึ่งจะได้เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์และการแตกของเซลล์เป็น 31.06 และ 20.96 ตามลำดับ ถ้าความกว้างของพัลส์มากหรือน้อยกว่านี้ ปริมาณการหลอมเซลล์ที่เกิดขึ้นจะลดลง

สาเหตุที่ทำให้เซลล์ แตกมากนั้นเกิดจากเซลล์ที่จะมาหลอมกันเมื่อกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่มีระยะเวลานานเกิน(ความกว้างของพัลส์มาก) ทำให้เซลล์ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้เซลล์จึงแตกมากกว่าที่เซลล์จะมาหลอมกัน ส่วนในกรณีที่ความกว้างของพัลส์ที่สั้นเกินไป จะมีผลทำให้เกิดรูไม่สมบูรณ์เพียงพอที่จะทำให้เซลล์หลอมรวมกันได้ เปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมจึงต่ำลง

ในการทดลองต่อไปได้กำหนดความกว้างของพัลส์คือ 10 μs ในการศึกษาผลของแรงดันสัญญาณคลื่นรูปพัลส์

5. การศึกษาผลของแรงดันคลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์

ในการศึกษาผลของแรงดันคลื่นรูปพัลส์ ได้ใช้ความกว้างพัลส์ 10 μs จำนวน 3 พัลส์ โดยได้เปลี่ยนแรงดันตั้งแต่ 50-400 V ใช้ภาวะของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ และสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 5.9 โดยผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.11



รูปที่ 5.11 ผลของแรงดันคลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์

จากผลการทดลองในรูปที่ 5.11 ค่าแรงดันของคลื่นรูปพัลส์ที่เหมาะสมคือ 250 V เมื่อขนาดความกว้างของพัลส์คือ 10 μs จำนวน 3 พัลส์ ถ้ากระตุ้นด้วยค่าแรงดันที่สูงกว่าหรือต่ำกว่า 250 V เปอร์เซ็นต์การหลอมของเซลล์ที่เกิดขึ้นจะลดลงและแนวโน้มเซลล์แตกจะเพิ่มตามแรงดันที่เพิ่มขึ้น

การที่เซลล์แตกมากขึ้นเมื่อเพิ่มแรงดันมีสาเหตุเช่นเดียวการศึกษาปัจจัยทางไฟฟ้าในหัวข้อที่ 3 และ 4 คือเมื่อเพิ่มค่าแรงดันมากกว่า 250 V โอกาสของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจะกลับสู่สภาพเดิมมีน้อยจึงทำให้เซลล์แตกมาก

เมื่อพิจาณาจากผลการทดลองในรูปที่ 5.9 - 5.11 จะเห็นว่าการกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ คือ จำนวนพัลส์ ความกว้างพัลส์และแรงดันพัลส์จะมีผลต่อการหลอมเซลล์ NS-1

โดยเมื่อกระตุ้นด้วยจำนวน ความกว้างและแรงดันคลื่นรูปพัลส์ที่มากเกินเซลล์เมมเบรนที่เกิดภาวะไม่เสถียรจะไม่สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้เซลล์จะแตกมากและหลอมกันได้น้อย ในทางกลับกันถ้ากระตุ้นด้วยภาวะที่กล่าวมานี้น้อยเกินเซลล์จะหลอมกันได้น้อยและเซลล์จะแตกน้อยเช่นกัน

จากการศึกษาภาวะต่าง ๆที่มีผลต่อการหลอมเซลล์ NS-1สามารถสรุปได้ดังนี้

1.สารละลายซอร์บิทอลที่เหมาะสมมีความเข้มข้น 70 mM ซึ่งเป็นภาวะไฮโปออสโมลาร์สำหรับเซลล์ NS-1

2.อิออนของแคลเซียมและแมกนีเซียมจะช่วยทำให้เซลล์หลอมกันได้ดีขึ้นและช่วยให้เซลล์แตกน้อยลง โดยความเข้มข้นของอิออนทั้งสองชนิดที่ทำให้เซลล์หลอมกันได้สูงสุดคือแคลเซียมอิออนความเข้มข้น 0.25 mM และแมกนีเซียมอิออนความเข้มข้น 0.5 mM

3.สัญญาณคลื่นรูปไซน์ที่ใช้ในการเรียงเซลล์ มีความถี่และความดันที่เหมาะสมคือ 1 MHz และ 30 V

4.สัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการกระตุ้นให้เซลล์หลอมรวมกัน สูงสุดมีขนาดพัลส์ จำนวนพัลส์ และแรงดันที่เหมาะสมคือ 10 μs, 4 พัลส์ และ 300 V ตามลำดับ

จากภาวะที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การหลอมเซลล์เป็น 37 % และเปอร์เซ็นต์การ แตกของเซลล์ เป็น 5 %

รูปแบบการเรียงและหลอมรวมกันของเซลล์ NS-1

จากการศึกษาภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการหลอมรวมเซลล์ NS-1 ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น การนับจำนวนเซลล์หลอมที่ได้จะนับจากภาพที่นำกลับมาฉายซ้ำอีกครั้งด้วยเทปวิดีทัศน์ ในหัวข้อนี้จะแสดงตัวอย่างการเรียงและหลอมรวมกันของเซลล์ เป็นภาพที่ได้จากการหลอมรวมเซลล์ NS-1 ในสารละลายซอร์บิทอล 70 mM ที่มีแมกนีเซียมอิออน 0.5 mM และแคลเซียมอิออน 0.25 mM ทำการกระตุ้นให้เซลล์มาเรียงตัวกันด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์แรงดัน 30 Vpp, ความถี่ 1 MHz และกระตุ้นให้เซลล์มาหลอมรวมกันด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10 μs และแรงดัน 300 V โดยแสดงรายละเอียดของขั้นตอนการเรียงและหลอมเซลล์ในรูปที่ 5.12 และ ขั้นตอนการหลอมเซลล์รูปที่ 5.13

รูปที่ 5.12 แสดงขั้นตอนการหลอมรวมเซลล์ตั้งแต่เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายสำหรับรวมเซลล์ เริ่มจากกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์จนกระทั่งเซลล์เข้ามาเรียงตัวกันแล้วจึงกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มหลอมรวมกัน โดยมีรายละเอียดของรูปดังนี้

รูปที่ 5.12ก แสดงภาพของเซลล์ NS-1ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์

รูปที่ 5.12ข แสดงภาพของเซลล์เมื่อเริ่มกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์

รูปที่ 5.12ค แสดงภาพของเซลล์ NS-1 หลังจากกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์เป็นเวลา 40 วินาที

รูปที่ 5.12ง แสดงภาพของเซลล์ NS-1 เมื่อกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์

รูปที่ 5.12จ แสดงภาพของเซลล์ NS-1 หลังจากกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์เป็นเวลา 50 วินาที

รูปที่ 5.13 แสดงขั้นตอนการหลอมเซลล์หลังจากกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ โดยทำการขยายภาพของเซลล์ 2 เซลล์ขณะหลอมรวมกัน โดยมีรายละเอียดการหลอมรวมเซลล์ดังนี้

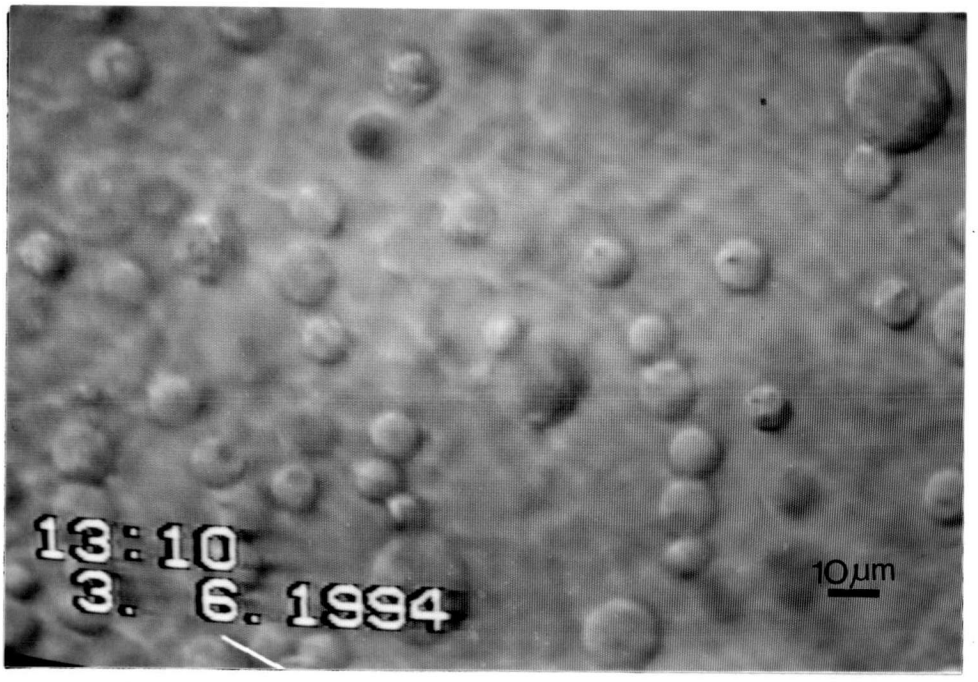
รูปที่ 5.13ก แสดงภาพของเซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นให้เรียงกันด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์

รูปที่ 5.13ข แสดงภาพของเซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ และเริ่มหลอมรวมกัน หลังจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 10 วินาที

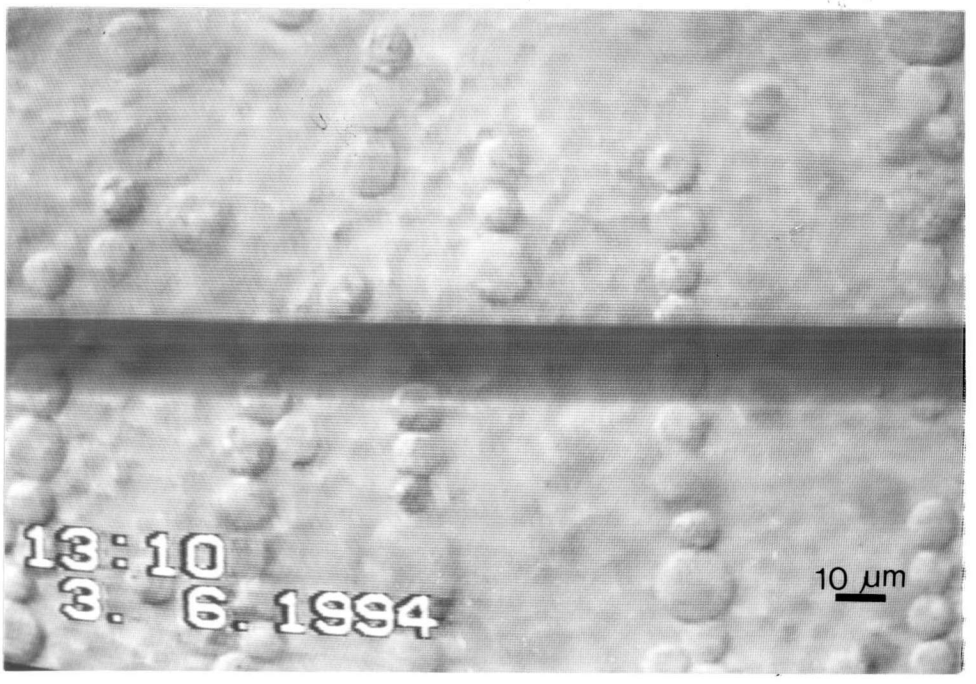
รูปที่ 5.13ค แสดงภาพของเซลล์ NS-1 ที่เข้ามาหลอมรวมกัน จะสังเกตุได้ว่ามีลักษณะของเซลล์ 2 เซลล์หลอมกัน หลังจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 20 วินาที

รูปที่ 5.13ง แสดงภาพของเซลล์ NS-1 ที่เข้ามาหลอมรวมกัน จะสังเกตุได้ว่ามีลักษณะเหมือนเซลล์ 1 เซลล์ หลังจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 40 วินาที

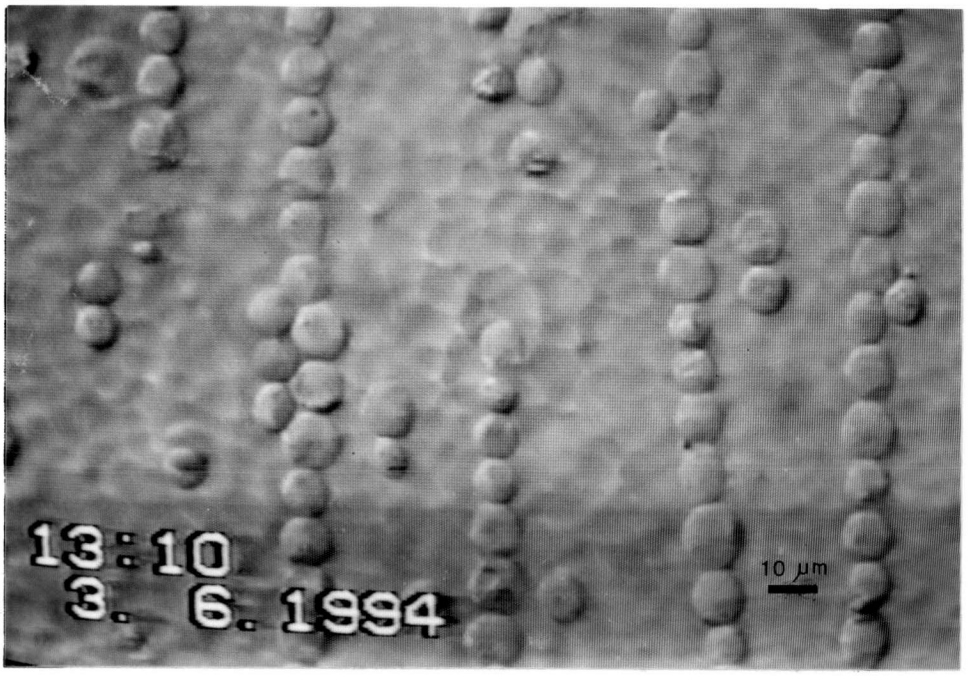
รูปที่ 5.13จ แสดงภาพของเซลล์ NS-1 ที่เข้ามาหลอมรวมกัน จะสังเกตุได้ว่ามีลักษณะเหมือนเซลล์ 1 เซลล์ หลังจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 60 วินาที



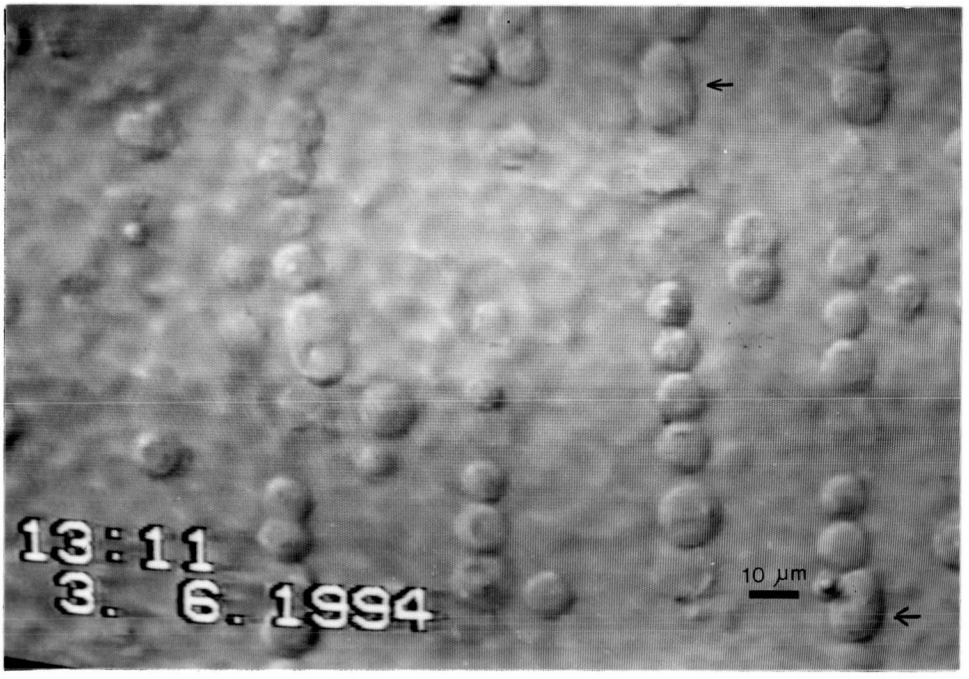
รูปที่ 5.12 ก เซลล์ NS-1 แขวนลอยอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์



รูปที่ 5.12 ข เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์

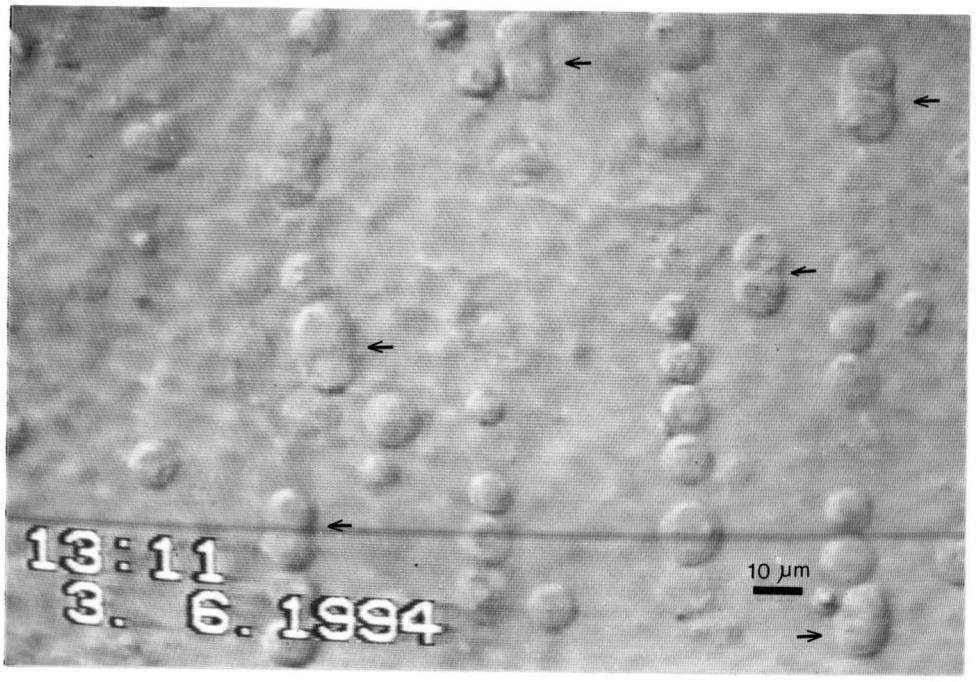


รูปที่ 5.12 ค เซลล์ NS-1 หลังจากกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์เป็นเวลา 40 วินาที



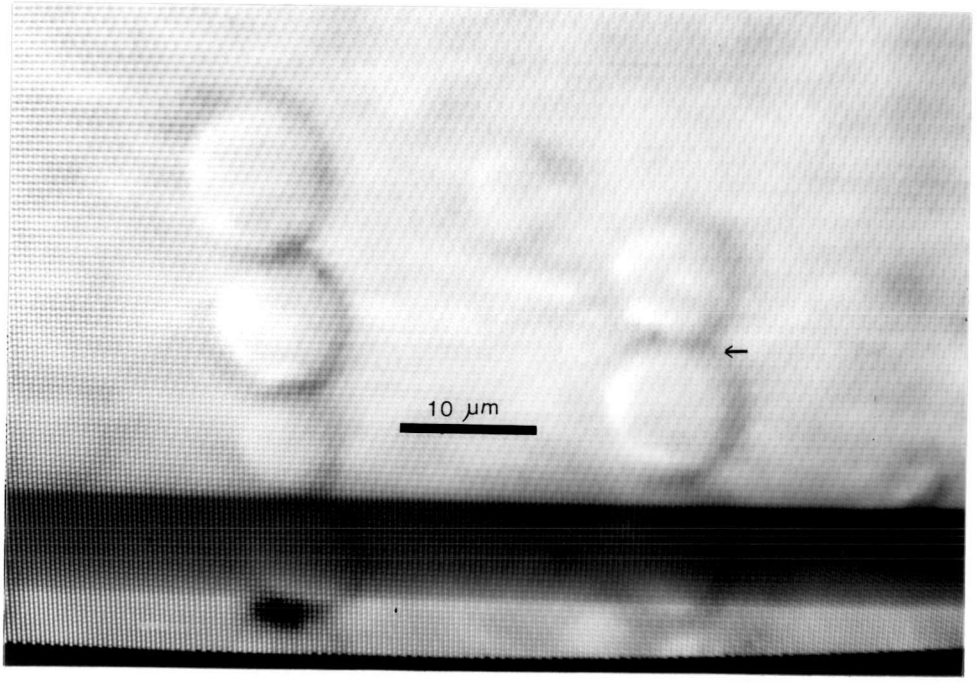
รูปที่ 5.12 ง เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์

ลูกศร : เซลล์ที่หลอมรวมกัน

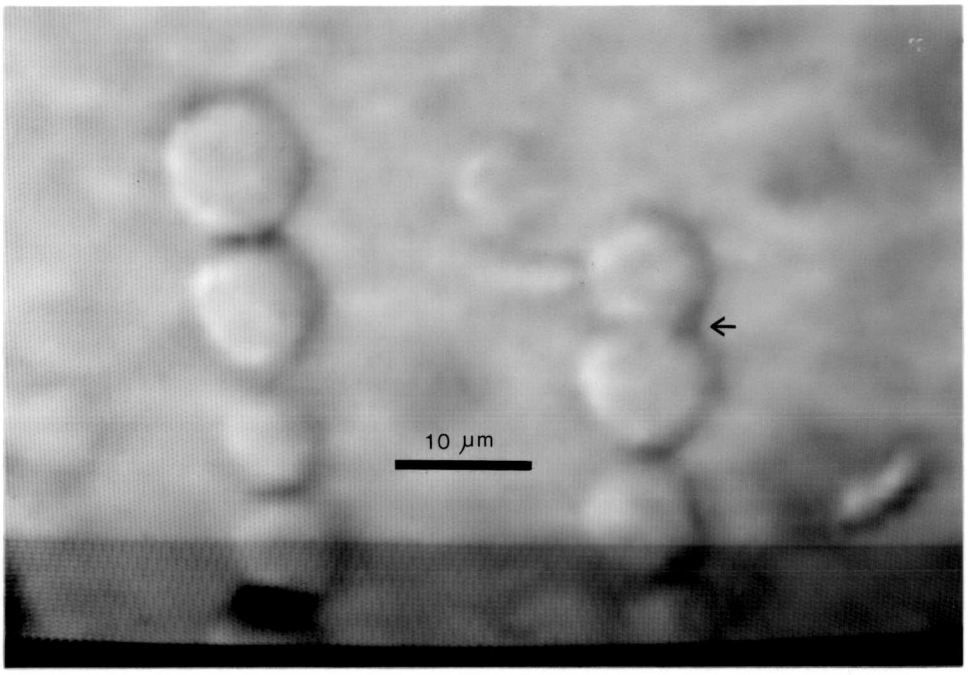


รูปที่ 5.12 จ เซลล์ NS-1 หลังจากกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์เป็นเวลา 50 วินาที

ลูกศร : เซลล์ที่หลอมรวมกัน

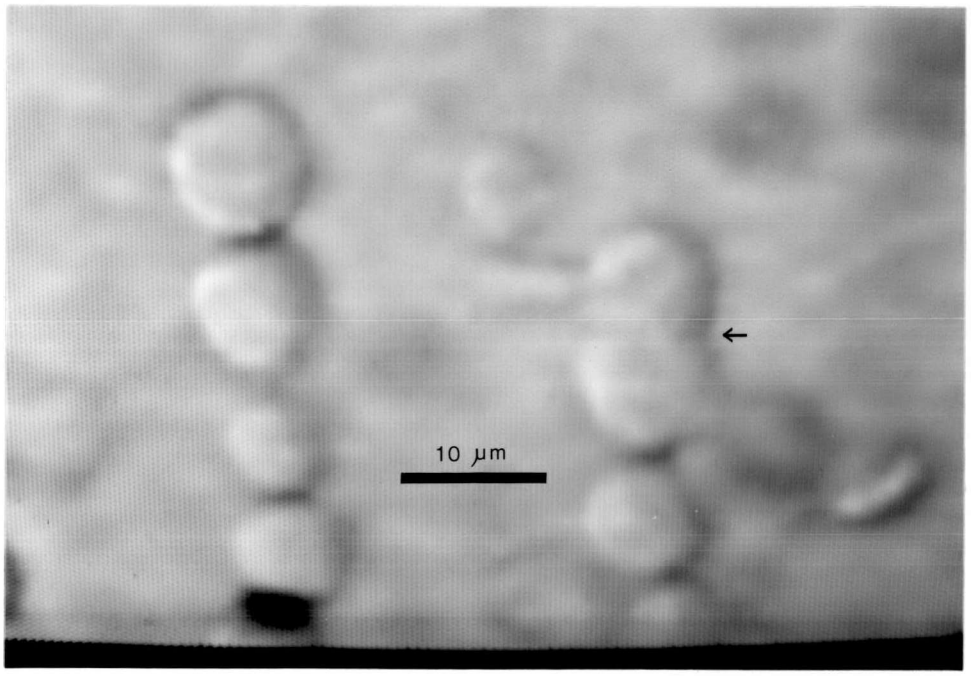


รูปที่ 5.13 ก เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นให้มาเรียงกันด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์



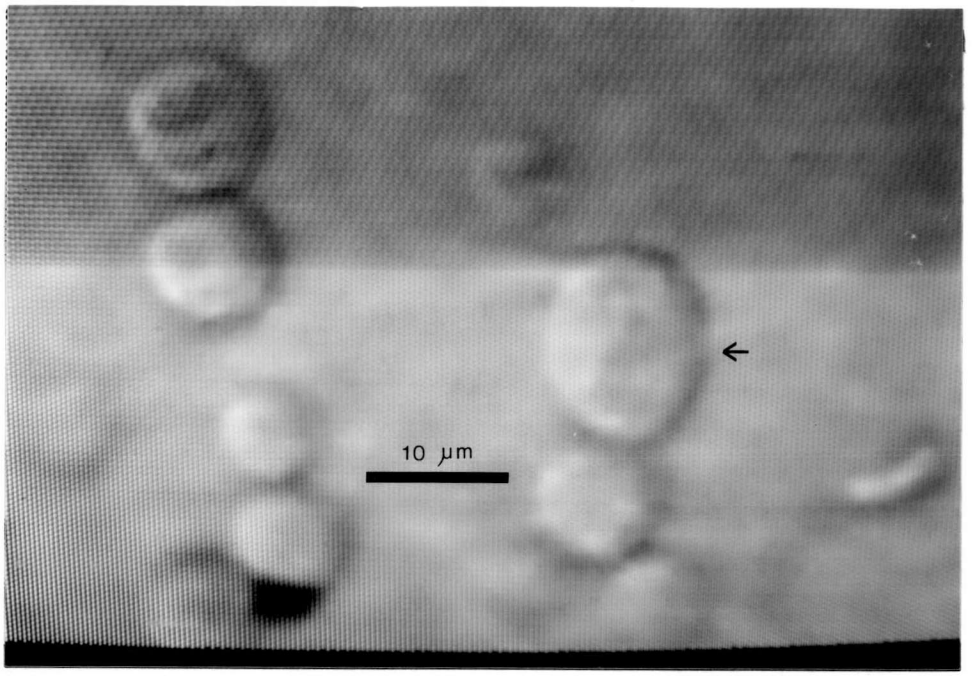
รูปที่ 5.13ข เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์หลังจากกระตุ้น 10 วินาที

ลูกศร : เซลล์ที่หลอมรวมกัน



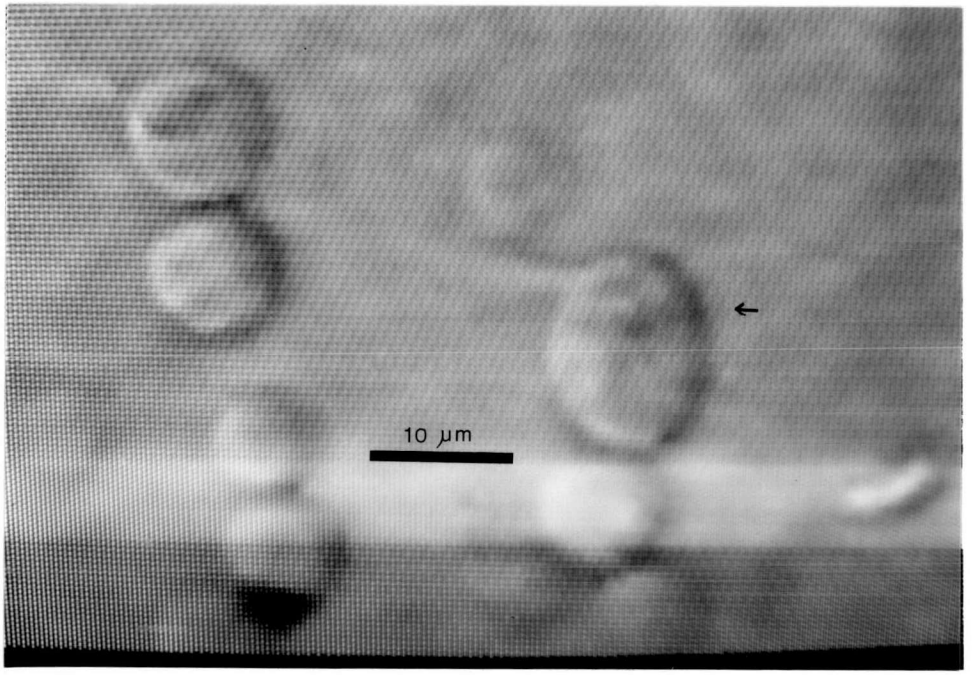
รูปที่ 5.13 ค เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์หลังจากกระตุ้น 20 วินาที

ลูกศร : เซลล์ที่หลอมรวมกัน



รูปที่ 5.13 ง เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์หลังจากกระตุ้น 40 วินาที

ลูกศร : เซลล์ที่หลอมรวมกัน



รูปที่ 5.13 จ เซลล์ NS-1 ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์หลังจากกระตุ้น 60 วินาที

ลูกศร : เซลล์ที่หลอมรวมกัน