บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

กลไกของการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า เริ่มต้นจากการใช้สัญญาณไฟฟ้ากระตุ้นเซลล์เมมเบรนให้เกิดรูก่อนเสมอ การที่ผิวเซลล์ในส่วนของชั้นไขมัน(Lipid bilayer membrane) เป็นโมเลกุลของสารประเภทไขมันที่มีขั้ว ดังนั้นในการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของชั้นไขมันในบริเวณนี้ ซึ่งการเรียงตัวใหม่ของชั้นไขมันนี้ทำให้เซลล์เมมเบรนเกิดรูที่ผิวเซลล์ได้ ผลคือเซลล์จะยอมให้สารหรือโมเลกุลผ่านเข้าออกเซลล์ได้ เรียกปรากฏการณ์ที่ผนังเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าเพื่อให้เกิดรูขึ้นนี้ว่าอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation)

ในปี คศ. 1967 Sale and Hamilton ได้สังเกตพบว่าการป้อนสนามไฟฟ้าที่สูงมากให้แก่เซลล์จะทำให้เซลล์แตกได้ และในปีต่อมาได้มีการรายงานว่า ส่วนของเซลล์เมมเบรนบางส่วนจะถูกทำลายเมื่อทำการป้อนสนามไฟฟ้าให้แก่เซลล์ [Sale and Hamilton ,1968] ต่อมามีการศึกษาพบว่าผิวของเซลล์จะเกิดรูได้และยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้เมื่อทำการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้า[Neumann and Rosenheck, 1972, Zimmermann *et al.*,1976 cited by Kinosita *et al.*, 1992, Kinosita and Tsong, 1977]

กลไกการเกิดรู(Pore formation)[Cole,1972 cited by Kinosita *et al.*, 1992] นั้นสันนิษฐานไว้ว่าเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าระหว่างเซลล์เมมเบรนด้านในกับด้านนอกให้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1 [Kinosita *et al*, 1992] เซลล์จึงจะเริ่มเกิดรูบนผิวเซลล์ได้ ถ้าให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าระหว่างผิวเซลล์ด้านในกับด้านนอกเป็น $\Delta\psi$ สามารถคำนวณหาค่านี้ได้จากสมการ 2.1 และ 2.2 [Cole, 1972; Neumann *et al.*, 1989; Kinosita and Tsong, 1977 cited by Tsong, 1992]

$$\Delta\psi_{membr} = 1.5\, r_{cell}\, E_{appl} \cos\theta\, [\, 1 - \exp(-t/\tau_{membr})] \qquad (2.1)$$

$$\tau_{membr} = r_{cell}\, C_{membr}\, (R_{int} + R_{ext}/2) \qquad (2.2)$$

เมื่อ τ_{membr} = เวลาที่ใช้ในการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าของเซลล์เมมเบรน

r_{cell} = รัศมีของเซลล์

t = เวลาที่ป้อนสนามไฟฟ้าให้แก่เซลล์

C_{membr} = ความจุไฟฟ้าของเซลล์เมมเบรนต่อหน่วยพื้นที่

R_{int} = ความต้านทานของสารละลายภายในเซลล์

R_{ext} = ความต้านทานของสารละลายภายนอกเซลล์

E_{appl} = สนามไฟฟ้าที่ป้อนให้เซลล์

θ = มุมของเส้นแรงสนามไฟฟ้าที่เทียบจากจุดศูนย์กลางของเซลล์

สำหรับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีขนาดเล็กอยู่ในระดับ μm เมื่อนำไปแทนค่าในสมการที่ 2.2 ค่า τ_{membr} ที่ได้จะมีค่าน้อยกว่า 1 μs และเมื่อนำไปแทนค่าในสมการที่ 2.1 จะได้ค่าของเทอมเอกซ์โพเนนเชียลมีค่าเข้าใกล้ 0 ถ้าในกรณีที่สนามไฟฟ้าที่ป้อนเป็นสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ จะสามารถคำนวณค่า $\Delta\psi_{membr,max}$ ได้จากสมการที่ 2.3

$$\Delta\psi_{membr,max} = 1.5\, r_{cell}\, E_{appl} \qquad (2.3)$$

ในกรณีที่ใช้สนามไฟฟ้าแบบกระแสสลับ(คลื่นสัญญาณรูปไซน์) เมื่อใช้ความถี่มากกว่า 100 kHz ค่าของสนามไฟฟ้าที่ป้อนให้จะเป็น $E_{appl} = E_{ac}\sin(2\pi f)t$ โดยค่า f คือความถี่ และ Eac คือสนามไฟฟ้าของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ เมื่อนำไปแทนค่าในสมการที่ 2.3 จะได้ค่า $\Delta\psi_{membr,max} = 1.5\, r_{cell} E_{ac}\sin(2\pi f)t$

แต่ถ้าความถี่น้อยกว่า 100 kHz สามารถคำนวณค่า $\Delta\psi_{membr}$ ได้จากสมการที่ 2.4 และ 2.5 [Marszalek at al, 1990; Pliquett, 1968 cited by Tsong, 1992]

$$\Delta\psi_{membr} = 1.5\, R_{cell}\, E_{appl} \cos\theta \,/[1+(2\pi f\tau_{membr})^2]^{1/2} \qquad (2.4)$$

$$\Delta\psi_{membr,max} = 1.5\, R_{cell}\, E_{ac} \cos\theta \,/[1+(2\pi f\tau_{membr})^2]^{1/2} \qquad (2.5)$$

จากสมการที่ 2.1 - 2.5 จะเห็นว่าค่าศักย์ไฟฟ้าที่เซลล์เมมเบรนจะขึ้นกับขนาดของเซลล์ ระยะเวลาและชนิดของสนามไฟฟ้าที่ป้อนให้แก่เซลล์ ซึ่งในการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้านั้นควรจะพิจารณาค่าเหล่านี้ด้วย

ในปี 1982 Zimmermann และคณะ ได้นำการทำไดอิเล็กโทรฟอรีซีสมาใช้ในการหลอมเซลล์ ซึ่งจะช่วยให้เซลล์เรียงตัวกันก่อน หลังจากนั้นจึงกระตุ้นให้เซลล์หลอมรวมกันอีกครั้ง

ขั้นตอนการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า

การหลอมเซลล์โดยใช้ไฟฟ้าจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

1.การทำให้เซลล์มาเรียงติดกันโดยการทำไดอิเล็กโทรฟอรีซิส(Dielectrophoresis) ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งสัญญาณคลื่นรูปไซน์ และสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบต่อเนื่องที่มีปริมาณของสนามไฟฟ้าไม่มากนัก(70-500 V/cm) และใช้ความถี่ที่มีค่าสูงในช่วง 800 กิโลเฮิทซ์(kHz) - 2 เมกกะเฮิทซ์(MHz)

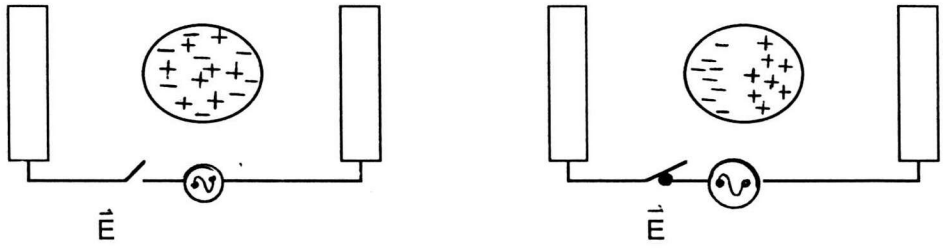
2.การหลอมเซลล์เข้าด้วยกัน เป็นการกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่มีสนามไฟฟ้าสูง(kV/cm) โดยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มาหลอมกันที่ใช้กันมากมี 2 แบบ คือ คลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล(Exponential decaying pulse) และคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม(Square wave pulse) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

คลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล คลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม

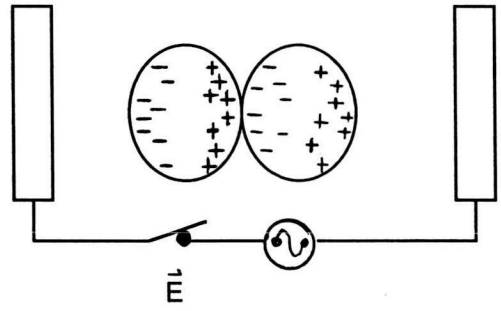
รูปที่ 2.1 คลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า

ตัวแปรสำคัญที่จะทำให้เซลล์หลอมกันได้คือระยะเวลาที่กระตุ้น โดยคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียลจะขึ้นกับครึ่งเวลาการลดลงของสัญญาณ(Decay half time,τ) และคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมจะขึ้นกับขนาดความกว้างของพัลส์ (Pulse width,t)

การหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้าในงานวิจัยนี้ เริ่มต้นด้วยการทำไดอิเล็กโทรฟอรีซีสแล้วกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ทันที สำหรับขั้นตอนที่เซลล์เข้ามาเรียงกันสามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 2.2 และ 2.3



รูปที่ 2.2 เซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าสัญญาณคลื่นรูปไซน์



รูปที่ 2.3 เซลล์เข้ามาเรียงติดกันเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าสัญญาณคลื่นรูปไซน์

จากรูปที่ 2.2 เซลล์ที่อยู่ในภาวะปกติอิออนภายในเซลล์จะมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ เมื่อทำการเปิดสวิทช์ให้สนามไฟฟ้าคลื่นรูปไซน์(ไฟฟ้ากระแสสลับ) จะทำให้โมเลกุลที่ประกอบเป็นเซลล์เมมเบรนถูกเหนี่ยวนำให้เกิดมีขั้วไฟฟ้าสลับไปมาตามความถี่ของสัญญาณไฟฟ้า ส่วนอิออนภายในเซลล์ก็จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนที่ไปมาตามความถี่ของสัญญาณไฟฟ้าที่ป้อน

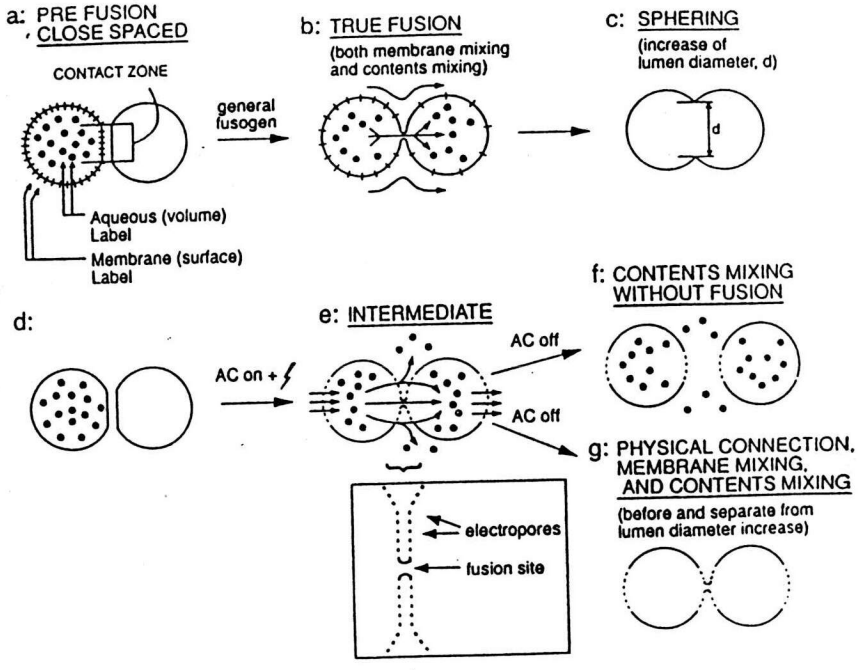
เช่นกัน ถ้าความถี่มีค่าต่ำการเหนี่ยวนำให้เกิดขั้วของเซลล์เมมเบรนและการเคลื่อนที่ของอิออนจะสามารถเปลี่ยนแปลงตามความถี่ได้ทัน จะทำให้เซลล์ถูกแรงเนื่องจากสนามไฟฟ้าให้เคลื่อนที่สลับไปมาตามทิศทางของสนามไฟฟ้า แต่เมื่อความถี่ของสัญญาณไฟฟ้ามีค่าสูงขึ้นจะทำให้เซลล์เมมเบรนเคลื่อนที่ตามความถี่ไม่ทัน แต่อิออนยังเคลื่อนที่ตามความถี่ได้ทัน และถ้าความถี่ของสัญญาณไฟฟ้ามีค่าสูงในระดับ 100 kHz - 2MHz จะทำให้ทั้งเซลล์เมมเบรน และอิออนจะเคลื่อนที่ตามความถี่ไม่ทัน และแรงลัพธ์ระหว่างเซลล์เป็นแรงดึงดูดกันเป็นผลให้เซลล์มาเรียงต่อกันเป็นดังรูปที่ 2.3 หลังจากนั้นหากเซลล์ได้รับสนามไฟฟ้าขนาดสูงราว 800 V/cm-7 kV/cm จะทำให้เซลล์จะมาหลอม รวมกันตามขั้นตอนที่จะกล่าวถึงต่อไปนี้

ขั้นตอนการหลอมรวมกันของเซลล์สามารถแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอนตามลำดับคือ

1. เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายมีความเข้มข้นเพียงพอที่เซลล์จะเข้ามาเรียงติดกันได้เมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้า
2. การกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแล้วทำให้ประจุภายในเซลล์เกิดโพราไรเซชันทำให้มีการจัดเรียงประจุภายในเซลล์ใหม่ และเซลล์เข้ามาเรียงติดกันตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไป
3. เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าความเข้มสูง (kV/cm) ของคลื่นสัญญาณรูปพัลส์ทำให้เกิดสภาวะที่เซลล์เมมเบรนไม่เสถียร (การเกิดรูที่เซลล์เมมเบรน)
4. หลังจากเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แล้ว เมมเบรนของเซลล์ 2 เซลล์จะเข้ามาเกาะและหลอมรวมกัน โดยมีการแลกเปลี่ยนสารประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์
5. เซลล์เมมเบรนกลับคืนสู่ภาวะเสถียร

จากขั้นตอนของการหลอมเซลล์เมื่อกระตุ้นโดยใช้ไฟฟ้าที่กล่าวมาทั้ง 5 ข้อนั้น เซลล์หลอมที่เกิดขึ้น จะพบได้ 3 กรณี คือ 1. รวมกันเฉพาะไซโทพลาซึม 2. รวมกันทั้งไซโทพลาซึมและนิวเคลียสแต่ไม่มีการรวมกันของดีเอ็นเอ 3.รวมกันทั้งโซโทพลาซึม นิวเคลียส และดีเอ็นเอ

ของเซลล์ทั้งสอง โดยทั้ง 3 กรณี เซลล์เมมเบรนของทั้งสองเซลล์เข้ามารวมกันกลายเป็นเซลล์เดี่ยว ในบางครั้งจะพบว่าเซลล์กลับสู่สภาพเดิมของแต่ละเซลล์โดยไม่มีการหลอมรวมกันของเซลล์เมมเบรน โดยอาจจะมีการแลกเปลี่ยนสารประกอบภายในเท่านั้น [Szaka, 1987 cited by Sower, 1992] แสดงการหลอมรวมเซลล์รูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ขั้นตอนการหลอมเซลล์ [Knutton and Pasternak, 1979; Duzgunes and Bentz,1988; Morris *et al.*,1988 cited by Sower, 1992]

การกำหนดว่าเซลล์หลอมที่ได้หลอมรวมกันหรือไม่นั้น Sowers (1988) ให้การนิยามไว้ว่า เซลล์หลอมที่เกิดขึ้นจากการหลอมเซลล์โดยใช้ไฟฟ้าจะต้องประกอบด้วย (1) การรวมกันของเซลล์เมมเบรน (membrane mixing), (2) การหลอมรวมกันของสารประกอบ (content mixing) ภายในเซลล์ และ (3) การติดกันของเซลล์เมมเบรนนั้นเป็นการเกาะติดทางกายภาพ(physical attachment) เซลล์ที่เกิดขึ้นจากการหลอมอาจจะมีลักษณะเป็นสายยาว (Chain of polysphere) เนื่องจากมีการรวมกันหลาย ๆ เซลล์ หรือ เป็นเซลล์เดียวที่มีขนาดใหญ่ (Single giant sphere)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า

1. ระยะเวลาและขนาดสนามไฟฟ้าที่ให้แก่เซลล์ ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญในการควบคุมการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า สำหรับสนามไฟฟ้าที่ให้นั้นเป็นได้ทั้งแบบคลื่นรูปสี่เหลี่ยม โดยจะขึ้นอยู่กับความกว้างของพัลส์(Pulse width) หรือครึ่งเวลาการลดลงของสัญญาณ(Decay half time) ของคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกซ์โพเนนเชียล(Exponentail decaying pulse)

2. ความเข้มข้นของอิออนในสารละลาย อิออนที่อยู่ในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์จะมีผลต่อการหลอมเซลล์ จากรายงานของ Sower ในปี 1989 ได้ทำการหลอมเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยใช้โซเดียมฟอสเฟต(Na_3PO_4) เป็นบัฟเฟอร์ พบว่าความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20-30 mM ถ้าใช้ความเข้นข้นมากกว่า 60 mM หรือใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า 15 mM จำนวนเซลล์หลอมที่ได้จะลดลง จากรายงานที่กล่าวมานี้จะเห็นได้ว่าถ้าในสารละลายมีอิออนน้อยเกินไปก็จะทำให้เซลล์หลอมกันน้อยและถ้าหากอิออนมีมากเกินไปจะทำให้สารละลายมีการนำไฟฟ้าสูงซึ่งจะทำให้สนามไฟฟ้าที่จะกระตุ้นแก่เซลล์ลดลง ส่วนการหลอมเซลล์เยื่อบุผิวหนัง (IBRS2 epithelial)[Zheng and Zhao, 1989] ซึ่งใช้แมกนีเซียมคลอไรด์($MgCl_2$) และการหลอมเซลล์ไฟโบบลาสท์(Fibroblast)[Suharev et. al, 1990 cited by Sower, 1992] ที่ใช้ NaCl หรือ KCl เป็น อิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมที่ได้จะเพิ่มตามความเข้มข้นของอิออนที่เติมลงไป และจากการศึกษาการหลอมเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์หลอมที่ได้จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl หรือ KCl [Blangaro and Teissie, 1985] การที่จำนวนเซลล์หลอมแตกต่างกันเมื่อใช้อิออนชนิดเดียวกัน สามารถอธิบายได้ว่าเซลล์แต่ละชนิดมีสภาพโครงสร้างและสารประกอบภายในเซลล์แตกต่างกัน การใช้อิออน มาช่วยในการหลอมเซลล์ทั้งความเข้มข้นและชนิดของอิออนที่ใช้จึงแตกต่างกัน

3. การทำไดอิเล็กโทรฟอรีซิส(dielectrophoresis) กับเซลล์เพื่อให้เซลล์เรียงตัวกัน จากรายงานวิจัยของ Sowers และคณะ(1989) พบว่าการเพิ่มขนาดของสนามไฟฟ้า

กระแสสลับจะช่วยให้เพิ่มปริมาณของเซลล์หลอมได้ ซึ่งทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้สำหรับระบบการหลอมเซลล์ด้วย

4. การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื่องจากภาวะเมแทบอลิซึม เกิดจากการเตรียมเซลล์ก่อนที่จะนำไปหลอมเซลล์ และระยะเวลาที่เซลล์อยู่ในสารละลายที่ใช้สำหรับหลอมเซลล์(fusion medium) อาจจะทำให้ส่วนของไซโตพลาสมิก(Cytoplasmic) และผิวเซลล์เกิดเมแทบอลิซึมขึ้นเป็นผลทำให้โครงสร้างบางส่วนของเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงได้

5. โครงสร้างของเซลล์ เซลล์ต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างของผิวเซลล์ที่ต่างกัน เช่น จากการศึกษาเปรียบเทียบการหลอมเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายและคนซึ่งมีขนาดของเซลล์เท่ากัน พบว่าเม็ดเลือดแดงของกระต่ายจะหลอมได้ง่ายกว่าเซลล์เม็ดเลือดของคน[Sower, 1989] ดังนั้นในการหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้าจะต้องพิจารณาทั้งส่วนประกอบของผิวเซลล์และสมบัติของเซลล์แต่ละชนิดด้วย

6.การมีสารโมเลกุลใหญ่เพียงเล็กน้อยในสารละลายเช่น BSA(Bovine serum albumin) หรือเด็กซ์แทรน(Dextran) มีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์หลอม(fusion yield)ได้ (A. E. Sower, 1990) นอกจากนี้ผลของ pH การมีสารผสมอื่น ๆ ในสารละลายและจำนวนของพัลส์ที่ให้ก็จะมีผลต่อการหลอมเซลล์ด้วย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาในรายละเอียดของปัจจัยดังนี้ คือ 1. ปัจจัยด้านชีวเคมีของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ต่อการหลอมเซลล์ โดยศึกษาถึงความเข้มข้นของสารละลายสำหรับหลอมเซลล์และอิออนในสารละลายสำหรับหลอมเซลล์ 2. ปัจจัยด้านไฟฟ้าต่อการหลอมเซลล์ เช่น ความถี่และแรงดันของสัญญาณคลื่นรูปไซน์ จำนวนพัลส์ ความกว้างพัลส์และแรงดันพัลส์ของสัญญาณคลื่นรูปพัลส์