

ระบบโซโนโพลีเอชันสำหรับเซลล์มะเร็งเต้านม *in Vitro* Sonoporation system of Breast Cancer Cells *in Vitro*

สมภพ รอดอัมพร

สาขาวิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

63 หมู่ 7 ตำบลอ้อมน้อย อำเภอบางคนที จังหวัดนครนายก 26120

E-mail: somphop@g.swu.ac.th

บทคัดย่อ

บทความวิจัยนำเสนอวิธีการโซโนโพลีเอชันที่มีบทบาทที่สำคัญต่อการนำส่งยีนและยาในการนำเข้าสู่เซลล์ ปัจจุบันการทำงานของโซโนโพลีเอชันมีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยทางด้านการนำส่งยีนเข้าสู่เซลล์ซึ่งวิธีการโซโนโพลีเอชันเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์และชีวิตของเซลล์งานวิจัยนี้ได้นำระบบโซโนโพลีเอชันมาศึกษาการทรานเฟกชันร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านม (BT-549) กับพารามิเตอร์ของความถี่โซโนเนชันของระบบโซโนโพลีเอชัน คือ 1.01 MHz, 1.05 MHz, 1.2 MHz และ 1.44 MHz การทำงานของระบบโซโนโพลีเอชันสามารถสร้างสัญญาณอัลตราโซโนนิคภายใต้ระบบโซโนโพลีเอชัน และผลการทดสอบได้บรรลุผลของการทรานเฟกชันร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านมมีผลการทรานเฟกชันเท่ากับ 13% ANOVA ($p < 0.5$) ที่ความถี่ 1.44 MHz ดังนั้นจึงมีความสนใจนำวิธีการโซโนโพลีเอชันไปประยุกต์ใช้กับการนำส่งสารพันธุกรรมและยาได้ นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการนำส่งพันธุกรรมกับการรักษา

คำสำคัญ: โซโนโพลีเอชัน เซลล์มะเร็งเต้านม (Breast cancer cell BT549) ทรานเฟกชัน

ABSTRACT

This paper presents the mechanism of sonoporation which has been effectively used to deliver gene and drugs into cells. Sonoporation has become an important role to enhance the delivery of genes into cells. This technique can also be utilized with marginal effect on viability. This research uses sonoporation technique to educate transfection with BT-549 (Breast cancer cells). This sonoporation system investigates under parameter conditions of resonance frequency which includes 1.01 MHz, 1.05 MHz, 1.2 MHz and 1.44 MHz. The sonoporation system can generate ultrasonic signal. These parameters can be used to perform the sonoporation system for Breast cancer cell lines (BT-549) *in vitro*. This study discusses the evidence based on the parameters of sonoporation for transfection results. The sonoporation system can achieve 13% ANOVA ($p < 0.5$) of BT-549 transfection efficiency at 1.44 MHz. Therefore, there is an increasing interest in sonoporation method for delivering gene into cells, and this method is important for the delivery of genes into cells as a therapy.

Keyword: Sonoporation, Breast cancer cell (BT549), transfection

1. บทนำ

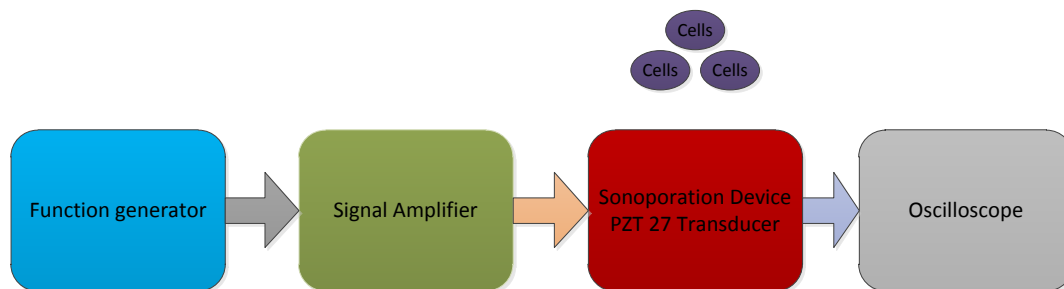
วิธีการโซโนโพเลชัน (sonoporation) นับเป็นวิธีการหนึ่งทางฟิสิกส์โดยใช้คลื่นความถี่ย่านอัลตราโซนิค มาช่วยในการทรานเฟกชัน (transfection) ให้กับเซลล์ ในการนำส่งสารพันธุกรรมยีน (gene) หรือยา (drug) เข้าสู่เซลล์[1-3] หลักการของทรานเฟกชันโดยใช้วิธีของโซโนโพเลชันจะทำหน้าที่เปิดรู (pore) ของเซลล์เพื่ออนุญาตให้สารพันธุกรรมเข้าไปภายในเยื่อ (membrane) และการนำส่งสารพันธุกรรมหรือ ยีน (gene) หรือดีเอ็นเอ (DNA)หรือโปรตีน และ คุณสมบัติเกี่ยวกับยา (drug) [4,5] เข้าไปภายในเซลล์เยื่อ (cell membrane) ในปัจจุบันมีนักวิจัยได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการทรานเฟกชันในแบบ *in vivo* และแบบ *in vitro* ในเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ งานวิจัยพืช และ เนื้อเยื่อ [1-3] เป็นต้น

การวิจัยทางด้านทรานเฟกชันกับโซโนโพเลชันได้นำไมโครบับเบิล (micro bubble) [2] เข้ามาช่วยการทรานเฟกชันเซลล์ โดยมีพารามิเตอร์ของความถี่ (frequency) ขนาดความดันคลื่น (pressure wave magnitude) และระยะเวลา (time) ของอัลตราโซนิค เป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำงานของโซโนโพเลชันกับเซลล์ การศึกษาการทำงานของทรานเฟกชันเป็นเรื่องที่มีความสำคัญต่อการพัฒนางานวิจัยด้านการนำส่งยา และการนำส่งสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยได้ทำการออกแบบโซโนโพเลชันสำหรับเซลล์มะเร็งเต้านม (BT459) เพื่อไปสู่การพัฒนาการนำส่งยาหรือสารพันธุกรรม งานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติระบบโซโนโพเลชันที่ได้ออกแบบกับเซลล์มะเร็งเต้านม (BT459) ในย่านความถี่ที่แตกต่างกัน 4 ย่านความถี่คือ

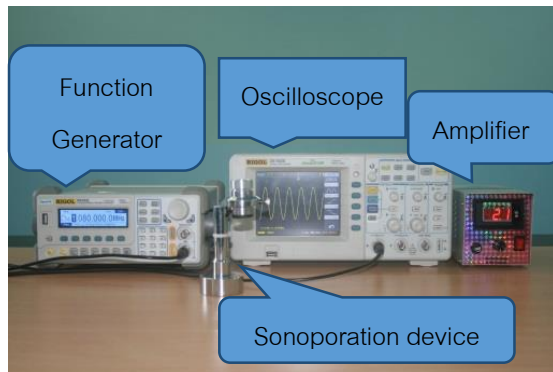
1.01 MHz, 1.05MHz, 1.23MHz และ 1.44MHz โดยความถี่ได้ถูกกำหนดโดยหลักการเซลล์อัลตราโซนิคเมนิคพูเลชัน (ultrasonic cell manipulation) ซึ่งความถี่ดังกล่าวสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยอาศัยหลักการของคลื่นนิ่ง (standing wave) ภายในอุปกรณ์ต้นแบบโซโนโพเลชันตามคุณสมบัติของอุปกรณ์ทรานสดิวเซอร์ และกำหนดให้เวลาที่เท่ากันคือ 1 นาที และแรงดัน 5Vp-p

2. ระบบโซโนโพเลชัน

บทความนี้ได้นำระบบโซโนโพเลชันดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยของระบบ คือ 1.อุปกรณ์โซโนโพเลชันต้นแบบ (The prototype of sonoporation device) ดังแสดงในรูปที่ 2 อุปกรณ์โซโนโพเลชันทำหน้าที่รองรับเซลล์มะเร็งเต้านมที่ใช้ในการทดสอบและทำหน้าที่สร้างสัญญาณอัลตราโซนิคมีการออกแบบโดยใช้อุปกรณ์ทรานสดิวเซอร์ PZT 27 (Piezoelectric) ของบริษัท Ferroperm Piezoceramics [6] 2. ชุดกำเนิดสัญญาณความถี่ โดยใช้เครื่องกำเนิดสัญญาณความถี่ (Function generator : RIGOL รุ่น DS1102E, 2channel 100MHz.1GSa/s) มีหน้าที่การกำเนิดสัญญาณอัลตราโซนิค ในย่านความถี่ 1 MHz ให้กับอุปกรณ์โซโนโพเลชัน 3.อุปกรณ์ขยายสัญญาณของระบบโซโนโพเลชัน ทำหน้าที่ขยายสัญญาณที่ได้รับจากเครื่องกำเนิดความถี่ให้สามารถกำลังที่เพียงพอต่อการทรานเฟกชัน 4.ออสซิลโลสโคป (Oscilloscope RIGOL รุ่นDG1022, 2channel 100 MHz 100 MSa/s) ทำหน้าที่ตรวจสอบสัญญาณของระบบโซโนโพเลชัน



รูปที่ 1 แผนภาพบล็อกระบบโซโนโพเลชัน (sonoporation system)



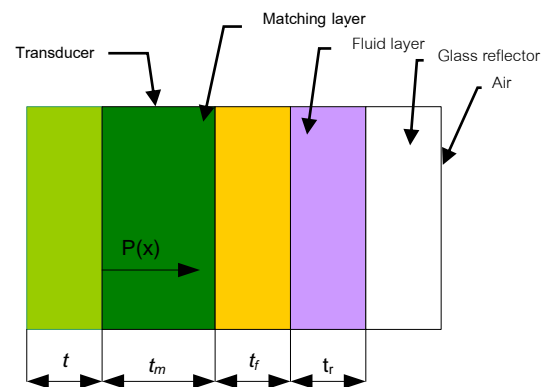
รูปที่ 2 ระบบโซโนโพเลชัน (sonoporation system)

การออกแบบโซโนโพเลชันได้มีการออกแบบโดยใช้หลักการของการออกแบบโดยทฤษฎีของพาร์ติเคิลอัลตราโซนิกเมนิพูเลชัน (Ultrasonic particle manipulation) และการทำงานของคลื่นนิ่ง (standing wave) สำหรับการจำลองและการออกแบบได้กล่าวไว้ในบทความวิจัย Rodamporn [7] และหลักการออกแบบโดยใช้เทคนิคของ M.Hill [8] และการจำลองโมเดลโดย M.Gröschl [9] โดยมีขนาดของโซโนโพเลชันอุปกรณ์โดยมีขนาดของอุปกรณ์คือ ส่วนของชั้นแมทชิง (Matching layer) มีหน้าที่ทำการปรับค่าของอิมพีแดนซ์ของทรานสดิวเซอร์ให้มีความเหมาะสมกับการใช้งานโซโนโพเลชัน โดยมีความหนาเท่ากับ 2.4 mm. สำหรับชั้นของส่วนของเหลว (Fluid layer) จะทำหน้าที่รองรับเซลล์และควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์ภายในชั้นของเหลวโดยอาศัยหลักการทำงานของพราติเคิลอัลตราโซนิกเมนิพูเลชัน (particle ultrasonic manipulation) และคลื่นนิ่ง (standing wave) ในการทำงานโดยความหนาของชั้น Fluid layer เท่ากับ 10 mm. สำหรับชั้นของการสะท้อน (Reflector layer) ของคลื่นนิ่งกลับเข้าสู่ชั้นของเหลว มีความหนาเท่ากับ 1.2 mm.

3. การทดสอบความถี่ของระบบโซโนโพเลชัน

การทดสอบระบบโซโนโพเลชันกับสัญญาณความถี่และแรงดันของระบบโดยมีเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบประกอบด้วยดังต่อไปนี้คือ 1. อุปกรณ์โซโนโพเลชัน

(sonoporation device) โดยผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้น
2. เครื่องกำเนิดสัญญาณความถี่ (Function generator : RIGOL รุ่นDS1102E, 2 channel 100 MHz. 1 GSa/s)
3. ออสซิลโลสโคป (Oscilloscope RIGOL รุ่นDG1022, 2 channel 100MHz. 100MSa/s) ในการทดสอบอุปกรณ์โซโนโพเลชันได้มีการติดตั้งอุปกรณ์ทดสอบและเชื่อมต่อระบบดังรูปที่ 5 ในการทดสอบระบบโซโนโพเลชันได้มีการบ่อนสัญญาณความถี่อินพุตตัวอย่างดังรูปที่ 6 และมีการวัดสัญญาณที่อุปกรณ์โซโนโพเลชันตามลำดับความถี่ คือ 1.01 MHz, 1.05 MHz, 1.23 MHz และ 1.44 MHz ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7 ถึงรูปที่ 10 แสดงผลความถี่ 1.01 MHz ถึงความถี่ 1.44 MHz ตามลำดับ



รูปที่ 3 โครงสร้างภายในของต้นแบบโซโนโพเลชัน

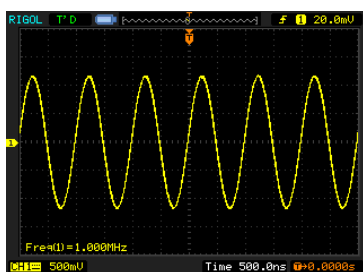


รูปที่ 4 อุปกรณ์ต้นแบบโซโนโพเลชัน (prototype of sonoporation device)

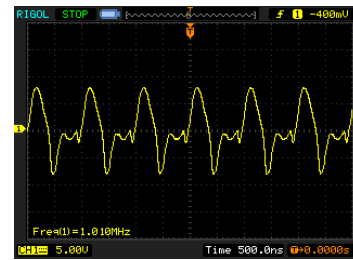
ผลการของการวัดสัญญาณความถี่ของระบบโซโนโพเลชั่นที่ได้ออกแบบสามารถกำเนิดสัญญาณย่านอุลตราโซนิคตามที่ได้มีการออกแบบตามหลักการของเซลล์อัลตราโซนิคเมนิคพลูชั่นที่ย่านความถี่ในช่วง 1.01 MHz ถึง 1.44 MHz แสดงในรูปที่ 6, 7, 8, 9 และรูปที่ 10 ตามลำดับตามย่านความถี่ที่ทดสอบ โดยแนวแกนตั้งเป็นส่วนแสดงค่าของแรงดันและแนวแกนนอนแสดงผลของความถี่ที่ได้จากการวัด จากทดสอบในงานวิจัยพบว่าความสมบูรณ์ของสัญญาณจะมีความแตกต่างไปจากสัญญาณอินพุตเนื่องจากการกำเนิดความถี่ได้ผ่านโครงสร้างของโซโนโพเลชั่นดังแสดงในรูปที่ 3 ทำให้การตอบสนองในส่วนของขนาดสัญญาณความถี่ในบางช่วงมีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างไรก็ตามผลการทดสอบสัญญาณดังกล่าวสามารถนำไปทดสอบกับการทรานสเฟคชั่นเซลล์มะเร็งเรื้อรังต่อไป ในการเปรียบเทียบถึงผลกระทบกับเซลล์มะเร็งเรื้อรังต่อความถี่ในหัวข้อถัดไป



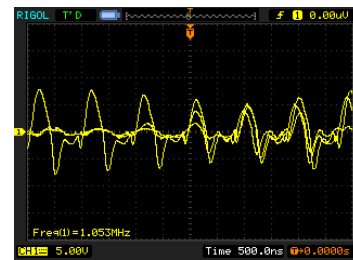
รูปที่ 5 การเชื่อมต่อระบบโซโนโพเลชั่นสำหรับการทดสอบย่านความถี่



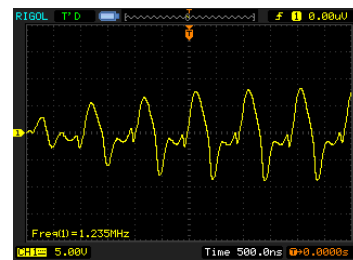
รูปที่ 6 ความถี่อินพุต 1MHz



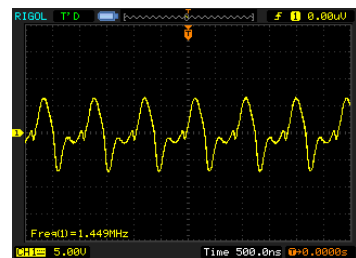
รูปที่ 7 ความถี่เอาต์พุต 1.01 MHz ของโซโนโพเลชั่น



รูปที่ 8 ความถี่เอาต์พุต 1.05 MHz ของโซโนโพเลชั่น



รูปที่ 9 ความถี่เอาต์พุต 1.23 MHz ของโซโนโพเลชั่น



รูปที่ 10 ความถี่เอาต์พุต 1.449 MHz ของโซโนโพเลชั่น

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบสัญญาณความถี่และแรงดัน
เอาต์พุตของโซโนโพลีเซชัน

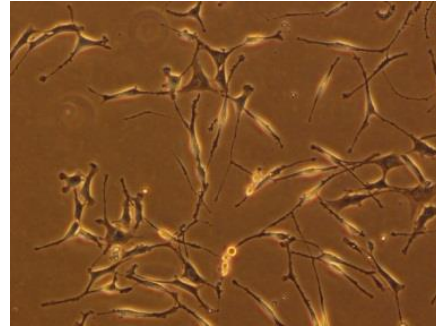
Input signal (MHz)	Input voltage (Vp-p)	Output Signal (sonoporation device) (MHz)	Output voltage (Vp-p)	% error freq.
1	5	1.01	13	1%
1.2	5	1.235	13	3%
1.4	5	1.449	12	3%

จากตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบค่าความถี่ของโซโนโพลีเซชันที่วัดได้เปรียบเทียบกับค่าอินพุตที่ป้อนให้กับอุปกรณ์โซโนโพลีเซชัน พบว่าค่าความถี่ที่สร้างขึ้นในระบบของอุปกรณ์โซโนโพลีเซชันมีความใกล้เคียงกับค่ากำหนดให้ทางอินพุตโดยมีความผิดพลาดค่อนข้างน้อย โดยมีค่าความผิดพลาดประมาณ 3% ANOVA ($P < 0.5$) ของสัญญาณอินพุตโดยมีการทดสอบจากกลุ่มตัวอย่างไม่น้อยกว่าเท่ากับ 5 ครั้ง สำหรับเอาต์พุตโวลต์ที่เพิ่มขึ้นอยู่กับการขยายของสัญญาณของอุปกรณ์ขยายสัญญาณโดยจะมีการขยายสัญญาณประมาณ 3 เท่าของสัญญาณอินพุตที่ได้รับเข้ามาของระบบโซโนโพลีเซชัน

4. การเตรียมเซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดมะเร็งเต้านม

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมเซลล์และการเพาะเซลล์มะเร็งเต้านม BT-549 (Japanese Collection of Research Bioresources (JRCB) Cell Bank, Japan) [10]ทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Gibco, USA) โดยอาหารเลี้ยงเซลล์มีส่วนประกอบดังนี้คือ D-glucose (high glucose) เท่ากับ 4,500 mg/L, L-glutamine เท่ากับ 4 mM, Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (Gibco, USA), penicillin/streptomycin (Invitrogen) โดยมีความเข้มข้นของ penicillin เท่ากับ 10,000 U/ml และ streptomycin เท่ากับ 10,000 $\mu\text{g/ml}$ ในตู้เลี้ยง

เซลล์ที่มีการควบคุมความชื้น และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 11 เซลล์มะเร็งเต้านม (BT549 control)

การเตรียมเซลล์มะเร็งเต้านม BT-549 สำหรับการทดสอบกับการโซโนโพลีเซชันขั้นตอนแรกจะทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และขั้นตอนที่สองทำการล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline, pH 7.4 และ ขั้นตอนที่สามทำการ trypsinize เซลล์ด้วย 0.25% trypsin EDTA หลังจากนั้นนำเซลล์มะเร็งเต้านมมาทำการบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ (Incubator) เป็นเวลา 3 นาทีเป็นขั้นตอนลำดับที่สี่และจากนั้นขั้นตอนที่ห้าทำการกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ และนำเซลล์ที่ผ่านการกระจายเซลล์มาทำการนับเซลล์ด้วย hemocytometer (HausserScientific, Horsham, PA) ตามจำนวนที่ต้องการใช้ในการทดลองร่วมกับเครื่องไมโครสโคป (Microscope) ยี่ห้อ Nikon รุ่น TS-100F ด้วยโปรแกรม Nis-Element Documentation จากนั้นนำเซลล์มะเร็งเต้านมไปทำการทดลองต่อไป

5. การทดสอบผลกระทบของความถี่ของระบบโซโนโพลีเซชันต่อเซลล์มะเร็งเต้านม

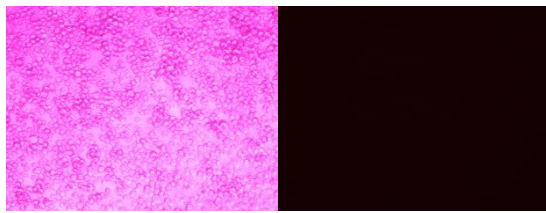
การทดสอบระบบโซโนโพลีเซชันกับเซลล์มะเร็งเต้านม (BT549) โดยแบ่งการทดสอบออกเป็นย่านความถี่ตั้งแต่ 1.01 MHz, 1.05 MHz, 1.2 MHz และ 1.4 MHz ตามคุณสมบัติที่ได้ออกแบบกับระบบโซโนโพลีเซชัน โดยมีการป้อนค่าอินพุตโวลต์ที่คงที่เท่ากับ 5Vp-p ซึ่งมีความเข้มข้นของพลังงาน (energy density) เท่ากับ

0.425KJ/m³ เพื่อให้การทำทรานเฟคชั่นได้ดีที่สุดและไม่ทำร้ายเซลล์ขณะทำการทดสอบการทรานเฟคชั่นเซลล์ การวิจัยนี้ได้ทำการทดลองในห้องทดลองที่อุณหภูมิห้องปกติเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการทดสอบดังต่อไปนี้คือ 1. ทำการเตรียมเซลล์มะเร็งเต้านม (BT549) ในปริมาณเท่ากับ 20 ไมโครลิตร (40,000 cells) โดยเซลล์ BT549 ที่ทดสอบจะอยู่ในสารเลี้ยงชนิด DMEM 2. ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ที่หรือที่เรียกว่า เซลล์ควบคุม (BT-549 control) เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับทำการทดลองในเงื่อนไขของความถี่ที่แตกต่างกัน 3. นำเซลล์มะเร็งเต้านม (BT549) มาทดสอบกับระบบโซโนโพลีเซชันโดยมีปริมาณเท่ากับ 20 ไมโครลิตร โดยทำการปรับความถี่ ตั้งแต่ 1.01MHz , 1.05MHz , 1.2MHz และ 1.4MHz ตามลำดับ และมีการให้อินพุตโวลต์เตจเท่ากับ 5 Vp-p โดยกำหนดเวลา exposure time คงที่เท่ากับหนึ่งนาที่ 4. เซลล์ที่ผ่านการทดสอบในแต่ละความถี่ จะดำเนินการทดสอบซ้ำในแต่ละกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 5 ครั้ง เพื่อความน่าเชื่อถือของกลุ่มตัวอย่างและผลของการทดสอบ เมื่อได้ทำการทดสอบเป็นที่เรียบร้อยแล้วเซลล์มะเร็งเต้านมจากนั้นจะนำเซลล์ที่ได้จากการทดสอบกลับเข้าไปเลี้ยงเซลล์ที่เงื่อนไขของการเลี้ยงเซลล์ นำไปเซลล์ภาชนะการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 24well plates ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้เลี้ยงเซลล์และการให้อาหารเลี้ยงเชื้อ (DMEM, Gibco, USA) เป็นเวลาเท่ากับ 24 ชั่วโมง โดยมีเงื่อนไขเดียวกับการเลี้ยงเซลล์

5.1 ผลการทดสอบเซลล์มะเร็งกับความถี่

การทดสอบจะดำเนินการทดสอบโดยใช้ความถี่ที่แตกต่างกัน โดยมีเวลาที่เท่ากัน โดยการทดสอบมีการให้ความถี่เรโซแนนซ์กับระบบโซโนโพลีเซชันเท่ากับ 1.01 MHz, 1.05 MHz, 1.2 MHz และ ความถี่เรโซแนนซ์ 1.44MHz ตามลำดับและมีแรงดันเท่ากับ 5Vp-p เวลาเท่ากับ 1 นาที่โดยการตรวจสอบผลการทดสอบในงานวิจัยนี้ได้ใช้เครื่องมือ hemocytometer (Hausser Scientific, Horsham, PA) และไมโครสโคป Microscope ยี่ห้อ Nikon รุ่น TS-100F และโปรแกรม Nis-Element Documentation เพื่อดูคุณลักษณะของเซลล์และการทรานเฟคชั่นที่เกิดขึ้นกับเซลล์มะเร็งเต้านม

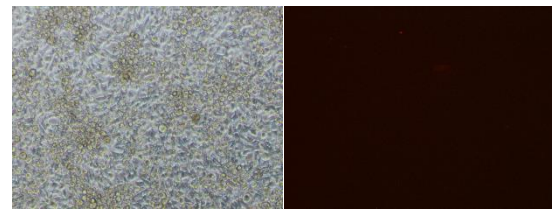
ผลการทดสอบได้แบ่งตามความถี่ที่ได้ทดสอบโดยเซลล์มะเร็งเต้านมจะทำการตรวจสอบเทียบกับเซลล์มะเร็งเต้านมแบบควบคุม โดยแบ่งเป็น 2 เงื่อนไขคือ 1. ทำการทดสอบเซลล์มะเร็งเต้านมที่ความถี่แตกต่างกัน ณ เวลา 0 นาที่ 2. ทำการทดสอบเมื่อเซลล์มะเร็งเต้านมผ่านไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตดูผลกระทบของเซลล์มะเร็งเต้านมจากการเปลี่ยนแปลงความถี่เรโซแนนซ์ของอุปกรณ์โซโนโพลีเซชัน จากการทดสอบในความถี่ที่แตกต่างกันของเรโซแนนซ์ของอุปกรณ์โซโนโพลีเซชันจะพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมส่วนใหญ่อยู่ในสภาวะปกติที่เวลา 0 นาที่ ดังรูปที่ 12 (ก), 14 (ก), 16 (ก) และ 18 (ก) ตามลำดับ โดยที่เวลา 0 นาที่ไมโครสโคป Nikon รุ่น TS-100F และโปรแกรม Nis-Element Documentation ถูกนำมาใช้ในการสังเกตการทรานเฟคชั่นจะยังไม่มีเซลล์มะเร็งเต้านมในความถี่เรโซแนนซ์ของอุปกรณ์โซโนโพลีเซชันเกิดการทรานเฟคชั่นเกิดขึ้น และไม่พบความเสียหายเกิดขึ้นบนเซลล์มะเร็งเต้านมทั้งในการทดลองทั้ง 4 กลุ่มความถี่เรโซแนนซ์ของอุปกรณ์โซโนโพลีเซชันดังแสดงในรูปที่ 13 (ข), 15 (ข), 17 (ข) และ 19 (ข) ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ผ่านการทดสอบทั้งหมดไว้ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีการควบคุมความชื้น และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เท่ากับ 5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเซลล์มะเร็งเต้านมจะถูกเก็บไว้ที่เวลาเท่ากับ 24 ชั่วโมงและเมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะนำเซลล์มะเร็งเต้านมดังกล่าวมาทำการการดูอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง และทำการล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline, pH 7.4 และทำการ trypsinize เซลล์ด้วย 0.25% trypsin EDTA และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบต่อนาทีนาน 3 นาที จากนั้นนำเซลล์มะเร็งเต้านมทำการกระจายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Gibco, USA) จากนั้นทำการสังเกตการณ์การเปลี่ยนแปลงในส่วนของทรานเฟคชั่นและความเสียหายของเซลล์โดยใช้ไมโครสโคป Microscope ยี่ห้อ Nikon รุ่น TS-100F และโปรแกรม Nis-Element Documentation ดังกล่าวไว้



(ก) (ข)

รูปที่ 12 การเปรียบเทียบเซลล์หลังจากการทดสอบ
ความถี่ 1.01 MHz ณ เวลาเริ่มต้น (0 นาที) โดยใช้
Fluorescent microscope สังเกตการณ์
เปลี่ยนแปลงของเซลล์

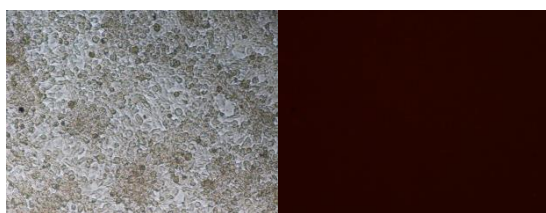
รูปที่ 12 (ก) แสดงผลของเซลล์หลังจากผ่านการทดสอบ
ที่ความถี่เรโซแนนซ์ของอุปกรณ์ ที่ 1.01 MHz จะเห็นว่า
เซลล์ยังคงอยู่ในสภาพปกติ และ รูปที่ 12 (ข) แสดงให้
เห็นถึงผลการทดสอบการทรานเฟคชั่น พบว่าไม่ปรากฏ
การเกิดทรานเฟคชั่นในความถี่เรโซแนนซ์ที่ 1.01 MHz



(ก) (ข)

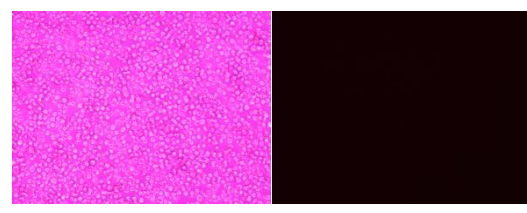
รูปที่ 15 การเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งเต้านม ที่ความถี่
1.05 MHz เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยใช้
Fluorescent microscope

จากรูปที่ 15 (ก) แสดงให้เห็นถึงเซลล์มะเร็งเต้านมยังอยู่
ในสภาพปกติหลังจากผ่านการทดสอบและมีเก็บไว้นาน
24 ชั่วโมงและ รูปที่ 15 (ข) เป็นการแสดงให้เห็นถึงผล
การทดสอบการทรานเฟคชั่นของเซลล์มีการเกิดขึ้น
ประมาณเท่ากับ 3 เปอร์เซนต์ ANOVA ($p < 0.05$)



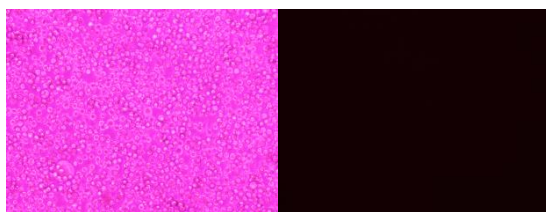
(ก) (ข)

รูปที่ 13 การเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งเต้านม ที่ความถี่
1.01 MHz เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยใช้
Fluorescent microscope



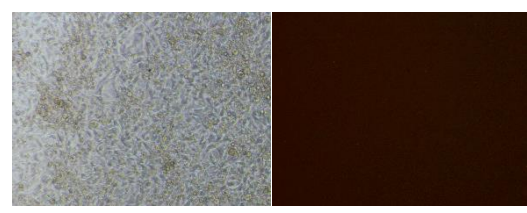
(ก) (ข)

รูปที่ 16 การเปรียบเทียบเซลล์หลังจากการทดสอบ
ความถี่ 1.2 MHz ณ เวลาเริ่มต้น (0 นาที) โดยใช้
Fluorescent microscope สังเกตการณ์
เปลี่ยนแปลงของเซลล์



(ก) (ข)

รูปที่ 14 การเปรียบเทียบเซลล์หลังจากการทดสอบ
ความถี่ 1.05 MHz ณ เวลาเริ่มต้น (0 นาที) โดยใช้
Fluorescent microscope สังเกตการณ์
เปลี่ยนแปลงของเซลล์

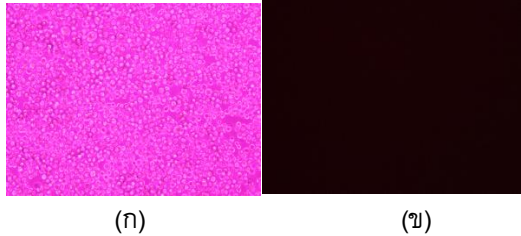


(ก) (ข)

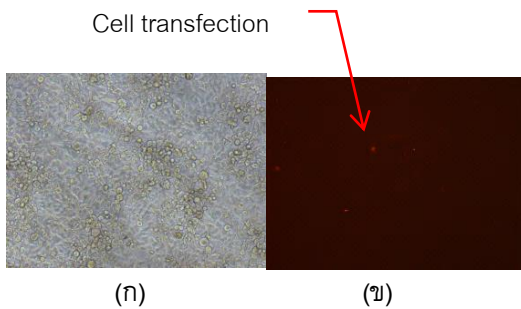
รูปที่ 17 การเปรียบเทียบเซลล์มะเร็งเต้านม ที่ความถี่
1.2 MHz เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงโดยใช้
Fluorescent microscope

รูปที่ 17 (ก) แสดงผลของเซลล์เมื่อผ่านการทดสอบ
ความถี่เรโซแนนซ์ของอุปกรณ์โซโนโพลเซชั่น จะเห็นว่า
เซลล์มะเร็งเต้านมไม่มีความเสียหาย และรูปที่ 17 (ข)

แสดงให้เห็นว่ายังไม่พบเซลล์ใดที่เกิดการทรานเฟกชัน
ขึ้นภายใต้เงื่อนไขดังกล่าว



รูปที่ 18 การเปรียบเทียบเซลล์หลังจากการทดสอบ
ความถี่ 1.44 MHz ณ เวลาเริ่มต้น (0 นาที) โดยใช้
Fluorescent microscope สังเกตการณ์
เปลี่ยนแปลงของเซลล์



รูปที่ 19 การเปรียบเทียบเซลล์เมื่อเริ่มที่ความถี่
1.44 MHz เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงโดยใช้
Fluorescent microscope

รูปที่ 19 แสดงผลการทดสอบความถี่เรโซแนนซ์ของ
อุปกรณ์โซโนโพลีเอชันที่ความถี่ต่างๆ หลังจากผ่านไป 24
ชั่วโมงพบว่า ที่ความถี่ 1.44 MHz การเกิดทรานเฟกชัน
ของอุปกรณ์โซโนโพลีเอชันซึ่งจะสังเกตจากเซลล์มีการ
เปลี่ยนแปลงคือมีการเกิดทรานเฟกชันเกิดขึ้นภายใต้เซลล์
โดยมีจุดสีแดงเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อเริ่มที่ความถี่รูปที่
19 (ข) เมื่อเทียบกับเซลล์ในรูปที่ 19 (ก) โดยให้ผลการ
เกิดทรานเฟกชันประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ ANOVA
($p < 0.05$) โดยใช้ hemocytometer (HausserScientific,
Horsham,PA) ร่วมกับ Fluorescent microscope ยี่ห้อ
Nikon รุ่น TS-100F และโปรแกรม Nis - Element
Documentation

6. สรุปและข้อเสนอแนะ

การออกแบบระบบโซโนโพลีเอชันสำหรับ
เซลล์มะเร็งเต้านม ได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ ระบบโซ
โนโพลีเอชันที่ได้ทำการทดสอบกับเซลล์มะเร็งเต้านม
ตัวอย่างภายใต้เงื่อนไขของความถี่ของระบบโซโน
โพลีเอชันที่มีความแตกต่างกันของความถี่เรโซแนนซ์
โดยทำงานในย่านของความถี่อัลตราโซนิก ซึ่งทำให้
เซลล์ที่ทดสอบได้รับผลกระทบต่อความถี่น้อยในแต่ละ
ย่านความถี่ที่ใช้ในการทดสอบ โดยความถี่ที่เหมาะสม
กับการทรานเฟกชันคือความถี่ 1.44 MHz โดยให้ผล
การทรานเฟกชันอยู่ที่ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ แสดง
ให้เห็นว่าระบบโซโนโพลีเอชันดังกล่าวสามารถนำไปใช้
งานในการนำส่งสารพันธุกรรมหรือยาได้ และเป็น
วิธีการที่มีความปลอดภัยต่อเซลล์และชีวิตของเซลล์
ข้อเสนอแนะควรมีการทดสอบกับเซลล์ภายใต้เงื่อนไข
ของเวลาและแรงดันที่แตกต่างกัน และเซลล์ชนิดอื่นๆ
เพิ่มเติมเพื่อได้ทราบถึงขีดความสามารถของระบบโซ
โนโพลีเอชันในงานวิจัยต่อไป

7. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณผู้สนับสนุนงบประมาณ
งานวิจัยเลขที่ 176/2556 มหาวิทยาลัยศรีนครินทร
วิโรฒ และภาควิชาวิศวกรรมคอมพิวเตอร์ ภาควิชา
วิศวกรรมชีวการแพทย์และ อาจารย์ ดร.กำพล วรดิษฐ์
ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้าที่สนับสนุนเครื่องมือในการทำ
การวิจัย และรวมทั้งศูนย์วิจัย (The Research
Center for Drug Discovery and Development)
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูดา จิตตสุโก
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อำนวยความสะดวกในเรื่องห้องทดลองเซลล์

8. เอกสารอ้างอิง

- [1] H.Yu and L. Xu, "Cell experimental studies on
sonoporation :State of the art and remaining
problemes" *Control Release*, vol.174, pp.151-
160, 2014

- [2] N.Kudo,Y. Tanaka,K. Uchida, “Basic Studies on Sonoporation with Size and Position-controlled Microbubbles Adjacent to cells”, UFFC,EFTF and PFM Symposium, pp.53-56, 2013
- [3] D.Carugo, D.N.Ankrett, P.Glynne-Jones, L. Capretto, R.J.Boltryk, X.Zhang, P.A. Townsend, and M.Hill “Contrast agent-free sonoporation: The use of an ultrasonic standing wave microfluidic system for delivery of pharmaceutical agents”, *Biomicrofluidic*, vol. 5, pp.044108-1 - pp.044108-15, 2011
- [4] D. L. Miller and C. Dou, “Induction of apoptosis in sonoporation and ultrasonic gene transfer” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 35, pp. 144–154, 2009.
- [5] H.D Liang, QL Lu, S.A Xue, M Halliwell, T Kodama, D.O Cosgrove, H.J Stauss, TA Partridge, MJ Blomley., “Optimisation of ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in skeletal muscle cells” *Ultrasound in Medicine & Biology* , vol.30, no. 11, pp. 1523–1529,2004
- [6] FerropermPiezoceramics A/S. (2014 January, 5). Ferroperm Data Matrix. [online] Available: <http://www.ferroperm-piezo.com>.
- [7] S.Rodamporn, N.R. Harris, S.P. Beeby , R.J Boltryk, T. Sanchez-Eisner, “HeLa Cell Transfection Using a Novel Sonoporation System ” *IEEE Trans. Biomedical Engineering*, vol. 58 ,no. 4 ,pp. 927 – 934, 2011.
- [8] M.Hill and R.J.K Wood, “Modelling in the design of a flow-through ultrasonic separator”, *Ultrasonic*, vol.38, pp.662-665, 2000.
- [9] M.GrÖshl, “Ultrasonic separation of suspended particles part 1: fundamentals,” *Acoustica*, vol.84, pp 432-447, 1998
- [10] BT-549 - CLS Cell Lines Service (2013 November, 8) [online] Available: http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4254/e4262/index_eng.html