

อิทธิพลของพลาสมาเย็นต่อเซลล์มะเร็งในโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจากวัสดุชีวภาพ

Impact of Plasma Treatment on Cancer Cell Culture in 3D Biomaterial Scaffold

กชกร มุลทรัพย์¹, สุรัักษณ์ อุดมสม² และ วัสสนัย วรธนัจฉริยา^{3*}

Kochakon Moonsub¹, Suruk Udomsom² and Wassanai Wattanutchariya^{3*}

^{1,3*} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีการผลิตขั้นสูง ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² ศูนย์วิศวกรรมชีวการแพทย์ สาขาวิชาวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

*Corresponding author : wassanai@eng.cmu.ac.th

บทคัดย่อ

มะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 3 ของโลก การรักษาโรคมะเร็งที่เป็นมาตรฐานในปัจจุบันมีหลากหลายวิธีแต่วิธีการรักษาเหล่านี้ก่อให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ป่วย ปัจจุบันเทคโนโลยีพลาสมาเย็นได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการรักษาเซลล์มะเร็งในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีงานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของพลาสมาเย็นในการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ปกติข้างเคียง อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้พลาสมาเย็นจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องประกอบด้วยกำลังพลาสมา ปริมาณก๊าซที่เกี่ยวข้องและเวลาสำหรับการทรีตเมนต์ ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาการรักษาเซลล์มะเร็งด้วยพลาสมาเย็นภายใต้วิธีการทางวิศวกรรมเนื้อเยื่อ โดยใช้โครงเลี้ยงเซลล์วัสดุชีวภาพแบบสามมิติที่มีส่วนประกอบของไฟโบรอินและไคโตซานที่ผ่านการขึ้นรูปด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็งสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์กระดูกอ่อนในระดับห้องปฏิบัติการ ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 วัน เพื่อใช้สำหรับการศึกษาผลของกำลังพลาสมา ปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอนและเวลาต่อการลดจำนวนของเซลล์มะเร็งโดยใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มะเร็งที่ผ่านการทรีตเมนต์ด้วยพลาสมาเย็นโดยใช้วิธี MTT พบว่า การใช้กำลังพลาสมา 30 วัตต์ ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอน 30 มิลลิลิตรต่ออนาที เป็นเวลา 30 วินาที สามารถลดจำนวนเซลล์มะเร็งได้สูงสุด โดยพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เหลือเพียง 83.33 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: โครงเลี้ยงเซลล์ ไฟโบรอิน ไคโตซาน พลาสมาเย็น มะเร็งกระดูกอ่อน มะเร็ง เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง การออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล

Abstract

Cancer is one of three major causes of death around the world. There are several techniques for cancer treatment. Nevertheless, most current treatments cause severe side effects to the patient. Recently, Cold Plasma technology has been introduced and implemented as a tumor and cancer therapy in mammalian cells. Several studies showed the benefit of Cold Plasma on cancer cell death induction without damaging neighboring normal cells. However, the Cold Plasma treatment conditions such as plasma power, gas, and time for properly treat the infected cell has not been clearly defined. In this study, investigation of Cold Plasma treatment on cancer cell will be performed based on tissue engineering approach. Three dimension scaffold plays an important role on the structure and biological mimic condition for cell adhesion and proliferation. This biomaterial 3D scaffold was fabricated from fibroin and chitosan using freeze drying technique, which then will be cultured with chondrosarcoma cells (cartilage cancer cells) incubated at 37°C 5% CO₂ for 1 day for the investigation. Then, the treatment of Cold Plasma with various conditions of electrical plasma power,

percentage of O₂ mixed gas, and duration will be investigated based on Factorial Experimental Design. Consequently, the survival cell percentage after Cold Plasma treatments will be determined by MTT assay. Finally, the results of survival cell percentage show that the condition of 30 s. treatment time, 30 ml/min O₂ with Argon and 30 Watt power causes the lowest cell viability of 83.33 percentage

Keywords: Scaffold, Fibroin, Chitosan, Cold Plasma Technology, Chondrosarcoma Cells, Cancer, Freeze Drying Technique, Full factorial design with center points, Design of Experiment

1. บทนำ

มะเร็งคือกลุ่มของโรคที่เกิดจากความผิดปกติของสารพันธุกรรมของเซลล์ร่างกาย ส่งผลทำให้เซลล์มีการเจริญและแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วและมากเกินไปผิดปกติ จากการจำแนกตามสาเหตุการตายของประชากรในประเทศไทยระหว่าง พ.ศ. 2554 ถึง 2558 พบว่าโรคมะเร็งเป็นสาเหตุการตายอันดับ 1 ซึ่งอัตราการตายจากโรคมะเร็งมีแนวโน้มว่าสูงขึ้นทุกปี [1] การรักษาโรคมะเร็งที่เป็นวิธีมาตรฐานในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ใช้การรักษาแบบผสมผสานกันระหว่างการผ่าตัด การใช้รังสีบำบัด และการรักษาด้วยยาเคมีบำบัด ซึ่งการผ่าตัดเป็นวิธีการรักษามะเร็งเฉพาะที่ แต่การรักษาที่มีค่าใช้จ่ายสูงและศัลยกรรมต้องมีความชำนาญเฉพาะ การรักษาด้วยรังสีบำบัดเป็นการรักษามะเร็งเฉพาะตำแหน่งที่วางแผนไว้ โดยใช้รังสีขนาดสูงจากแหล่งกำเนิดรังสี ซึ่งการฉายแสงนี้รังสีจะผ่านผิวหนังไปยังตำแหน่งที่ต้องการทำให้เกิดผลข้างเคียงต่ออวัยวะได้ การรักษาด้วยยาเคมีบำบัดเป็นการรักษาด้วยสารเคมีที่มีผลทำลายเซลล์มะเร็ง โดยที่กลไกการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัดนั้นเป็นการขัดขวางการแบ่งเซลล์ ทำให้มีผลต่อเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติที่มีคุณสมบัติในการเจริญและแบ่งตัวเร็วด้วย

เนื่องด้วยข้อจำกัดและข้อเสียของวิธีการรักษามะเร็งในปัจจุบันดังที่กล่าวในข้างต้น วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสะดวกและเป็นทางเลือกในการรักษามะเร็งคือการใช้เจ็ทพลาสมาแบบไม่กำเนิดความร้อน เจ็ทพลาสมาเป็นรูปแบบหนึ่งของพลาสมา จัดเป็นพลาสมาอุณหภูมิต่ำที่ความดันบรรยากาศ ก๊าซที่ป้อน (Feed gas) ส่วนใหญ่เป็นก๊าซเฉื่อย และมีองค์ประกอบของก๊าซที่ทำปฏิกิริยา (Reactive gas) เช่น ออกซิเจน (Oxygen) เล็กน้อย พลาสมาจะเกิดจากการผ่านกระแสไฟฟ้าระหว่างขั้วไฟฟ้า 2 ขั้ว ที่คลื่นความถี่วิทยุค่าหนึ่งทำให้โมเลกุลก๊าซที่ป้อนและก๊าซที่ทำปฏิกิริยาเกิดการแตกตัวอยู่ในสถานะที่ถูกกระตุ้นมีพลังงานสูงและจะถูกขับออกมาทางรูเปิดที่แคบด้วยการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้าและการไหลของอากาศ (air flow)

ให้มีรูปร่างเป็นลำเจ็ทหรือรูปร่างคล้ายเข็ม ซึ่งไอออนและอิเล็กตรอนที่ถูกปล่อยออกมาจะมีอายุสั้น โดยจะสลายไปผ่านทางกระบวนการรวมกันใหม่ (recombination) [2] จากงานวิจัยของ Joh และคณะในปี 2012 ได้กล่าวถึงการประยุกต์ใช้พลาสมาที่ความดันบรรยากาศในทางชีววิทยาและทางการแพทย์ รวมไปถึงการฆ่าเชื้อ การรักษาบาดแผล และการรักษามะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้พลาสมาที่ความดันบรรยากาศในการรักษามะเร็งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจาก Reactive Oxygen Species (ROS) จากพลาสมาสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็ง มากไปกว่านั้นยังมีการศึกษาเปรียบเทียบผลของพลาสมาต่อเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ โดยจากงานวิจัยของ Keidar และคณะในปี 2013 ได้ศึกษาผลกระทบของพลาสมาต่อเซลล์มะเร็งเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติในระดับห้องปฏิบัติการ โดยพลาสมาสามารถลดจำนวนเซลล์มะเร็งโดยไม่สร้างความเสียหายแก่เซลล์ปกติอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก reactive oxygen species ที่เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ [3] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yan และคณะในปี 2015 ซึ่งได้อธิบายว่าในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งมี Aquaporins มากกว่าเซลล์ปกติซึ่ง Aquaporins คือท่อส่งน้ำที่ทำหน้าที่ส่งผ่านโมเลกุลเล็กเข้าสู่เซลล์ เมื่อ Hydrogenperoxide (H₂O₂) จากพลาสมาเข้าไปในเซลล์จะกระตุ้นกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ ดังนั้นเซลล์มะเร็งจึงมีอัตราการตายมากกว่าเซลล์ปกติ [4] จึงมีแนวคิดในการนำพลาสมาประยุกต์ใช้ในการลดจำนวนเซลล์มะเร็งเพื่อลดภาวะแทรกซ้อน ซึ่งผลกระทบในการเกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสนี้ขึ้นอยู่กับเงื่อนไขในการควบคุมปัจจัยในการทรีตเมนต์พลาสมาประกอบด้วย กำลังพลาสมา ก๊าซ อัตราการไหลของก๊าซ และเวลาในการทรีตเมนต์พลาสมา โดยผลกระทบของ ROS ที่ทำปฏิกิริยาออกซิเดทีฟซึ่งเป็นสาเหตุหลักของความเสียหายของ DNA นำไปสู่การตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส [5] สอดคล้องกับ

งานวิจัยของ Cooke และคณะในปี 2003 ซึ่งกล่าวว่าสาเหตุที่พบมากที่สุดที่ทำให้เกิดความเสียหายของ DNA ในเซลล์คือ ROS ที่เป็น Reactive OH radical ทำปฏิกิริยากับ DNA โดย OH radical ที่เข้าไปรวมตัวกับพันธะคู่ของ DNA ทำให้เกิดการสลัดไฮโดรเจนอะตอมจากตำแหน่งที่มีกลุ่มเมธิล หรือ C-H bond ของ 2'-deoxyribose ส่งผลให้ DNA เกิดความเสียหายนำไปสู่การตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์ [6]

ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์ชีววัสดุทางการแพทย์เป็นไปอย่างแพร่หลาย เนื่องจากคุณสมบัติอันพึงประสงค์ทางด้านชีวภาพจึงมีการวิจัยพัฒนาคุณสมบัติของชีววัสดุดังกล่าวเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งานเชิงการแพทย์ในหลายแง่มุม มีหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษเกี่ยวกับไหมไฟโบรอินว่าเป็นโปรตีนเส้นใยธรรมชาติที่มีศักยภาพสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานชีวการแพทย์เนื่องจากเป็นวัสดุที่มีความยืดหยุ่นทางชีวภาพมีความเข้ากันได้ดีกับร่างกาย มีคุณสมบัติเชิงกลที่ดี และสามารถย่อยสลายได้ [7-9] จากงานวิจัยของ Unger และคณะในปี 2007 ที่ได้กล่าวถึงไหมไฟโบรอินว่าเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับโครงเลี้ยงเซลล์ เพราะมีการซึมผ่านของออกซิเจนและไอน้ำได้ดีทำให้เกิดการอักเสบของร่างกายน้อยที่สุด [10] ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yan และคณะในปี 2012 และ Chlapanidas และคณะในปี 2011 ที่ได้กล่าวว่าไหมไฟโบรอินที่เป็นวัสดุทางชีวภาพสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้หลากหลายรวมทั้งเซลล์กระดูกอ่อนบนพื้นผิวของไฟโบรอินอีกด้วย [11-12] จากงานวิจัยของ Bhardwaj และคณะในปี 2012 ได้ศึกษาการเจริญของเซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเลี้ยงเซลล์ชนิดเนื้อพรูณจากไหมไฟโบรอินและโคโตซาน โดยศึกษาการก่อตัวของเซลล์กระดูกอ่อนจากเซลล์ต้นกำเนิดของหนูชนิดมีเซนไคมอล (Mesenchymal Stem Cells) ผลการศึกษาสรุปได้ว่าโครงเลี้ยงเซลล์จากไฟโบรอินผสมโคโตซานส่งเสริมการเจริญเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอลสำหรับซ่อมแซมเซลล์กระดูกอ่อน [13] สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dana และคณะในปี 2004 ที่ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดบนโครงเลี้ยงเซลล์จากโคโตซานจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โครงเลี้ยงเซลล์จากโคโตซานมีศักยภาพที่จะใช้เป็นวัสดุสำหรับวิศวกรรมเนื้อเยื่อกระดูกอ่อน เนื่องจากเซลล์มีการเจริญได้ดีในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนที่มีลักษณะรูเชื่อมต่อกันภายในโครงเลี้ยงเซลล์จากโคโตซานสนับสนุนการยึดเกาะของเซลล์ [14] จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Thunsiri และคณะในปี 2015 ได้ทำการศึกษาโครงเลี้ยงเซลล์จาก โคโตซาน ไฟโบรอิน และไฮดรอกซีอะพาไทต์ ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อผลิตโครงสร้างที่มีรูพรุน

โดยเลือกโคโตซานเป็นโครงสร้างหลักของโครงเลี้ยงเซลล์ที่กำหนดอัตราส่วน 50 เปอร์เซ็นต์โดยอัตราส่วนน้ำหนักของชิ้นงานทดสอบ ส่วนอีก 50 เปอร์เซ็นต์เป็นอัตราส่วนต่างๆของไฟโบรอินและไฮดรอกซีอะพาไทต์ จากผลการทดลองพบว่าโครงเลี้ยงเซลล์ทุกอัตราส่วนกระตุ้นการเจริญของเซลล์กระดูกอ่อน ในงานวิจัยมีเป้าหมายคือเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน ซึ่งในกระดูกอ่อนปกติจะไม่มีส่วนผสมของไฮดรอกซีอะพาไทต์ ดังนั้นในการทดลองผู้วิจัยจึงเลือกใช้อัตราส่วนโครงเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีส่วนผสมของไฮดรอกซีอะพาไทต์คืออัตราส่วนโคโตซาน 50 เปอร์เซ็นต์ และ ไฟโบรอิน 50 เปอร์เซ็นต์ และขึ้นรูปด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง [15] จากศักยภาพของวัสดุชีวภาพดังกล่าวจึงนำมาประยุกต์ใช้สำหรับเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนเพื่อจำลองสภาวะที่ใกล้เคียงในร่างกายในการรักษาด้วยพลาสมาเย็น

ในการใช้เจ็ทพลาสมาเย็นมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการทรีตเมนต์เซลล์มะเร็งจึงมีการใช้หลักการออกแบบการทดลอง คือการทดลองที่พิจารณาถึงผลที่เกิดจากการรวมกันของระดับของปัจจัยทั้งหมดที่เป็นไปได้ในการทดลอง ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากอันตรกิริยาของปัจจัยที่จะก่อให้เกิดข้อสรุปที่ผิดพลาดได้ เนื่องจากเป็นการออกแบบการทดลองที่มีประสิทธิภาพเหนือกว่าการทดลองที่ละปัจจัยและทำให้สามารถประมาณผลของปัจจัยหนึ่งๆที่ระดับต่างๆ ของปัจจัยอื่นได้รวมทั้งได้ข้อสรุปที่สมเหตุสมผลตลอดเงื่อนไขของการทดลอง เพื่อประเมินผลกระทบและหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการใช้พลาสมาเย็นกับเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนบนโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจากไฟโบรอินและโคโตซานซึ่งเป็นสภาวะจำลองที่ใกล้เคียงกับสภาวะจริงในร่างกายมากที่สุด เพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาโรคมะเร็งแทนการรักษาในปัจจุบันที่มีผลข้างเคียงหรือเกิดภาวะแทรกซ้อนและเป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วยตลอดจนการมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นในอนาคต

2. การออกแบบการทดลอง

ในการศึกษาใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลที่จุดกึ่งกลาง กำหนดปัจจัยในการทดลอง 3 ปัจจัย ได้แก่ เวลา (วินาที) แทนด้วยสัญลักษณ์ A ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอน (มิลลิลิตรต่อวินาที) แทนด้วยสัญลักษณ์ B และ กำลังพลาสมา (วัตต์) แทนด้วยสัญลักษณ์ C โดยมีระดับขอบเขตของปัจจัยซึ่งประกอบด้วยระดับสูง ระดับต่ำ และจุดกึ่งกลาง ดังตารางที่ 1 ทำการทดลองโดยใช้พลาสมาทรีตเมนต์เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์

แบบสามมิติ และทำการทดลองชุดควบคุม(Control) คือไม่ทรีดเมนต์พลาสติกมา ดังตารางที่ 2 เพื่อทดสอบการรักษามะเร็งกระดูกอ่อนบนโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติที่สังเคราะห์จากไฟโบรอินและโคโตซานด้วยพลาสติกมาเย็น กำหนดผลตอบคือผลการวิเคราะห์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ที่ได้จากการทดลองโดยวิธี MTT assay (y_1) ซึ่งมีค่าเป้าหมายคือจำนวนเซลล์มะเร็งที่ลดลง โดยจะทำการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์แต่ละการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับในการทดลอง

สัญลักษณ์	ปัจจัย	หน่วย	ระดับขอบเขตของปัจจัย		
			ต่ำ (-1)	จุดกึ่งกลาง (0)	สูง (+1)
A	Time	s.	30	75	120
B	Ar/O ₂	ml/min	10	20	30
C	Power	Watt	10	20	30

ตารางที่ 2 ตารางออกแบบการทดลองการใช้พลาสติกมาทรีดเมนต์เซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนบนโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ

ลำดับการทดลอง	Factor		
	Time	O ₂ /Ar	Power
1	30 (-1)	10 (-1)	10 (-1)
2	120 (+1)	10 (-1)	10 (-1)
3	30 (-1)	30 (+1)	10 (-1)
4	120 (+1)	30 (+1)	10 (-1)
5	30 (-1)	10 (-1)	30 (+1)
6	120 (+1)	10 (-1)	30 (+1)
7	30 (-1)	30 (+1)	30 (+1)
8	120 (+1)	30 (+1)	30 (+1)
9	75 (0)	20 (0)	20 (0)
10	75 (0)	20 (0)	20 (0)
11	75 (0)	20 (0)	20 (0)
12*	-	-	-

* Control ไม่ทรีดเมนต์พลาสติกมา

3. การทดลองเลี้ยงเซลล์

3.1 เตรียมและสังเคราะห์สารเคมี

1) กระบวนการสังเคราะห์ไฟโบรอิน

การสังเคราะห์ไฟโบรอินจากรังไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ-1 จากศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่ โดยทำการคัดแยกสิ่งสกปรกออกจากรังไหมก่อน จากนั้นนำไปต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดสาร

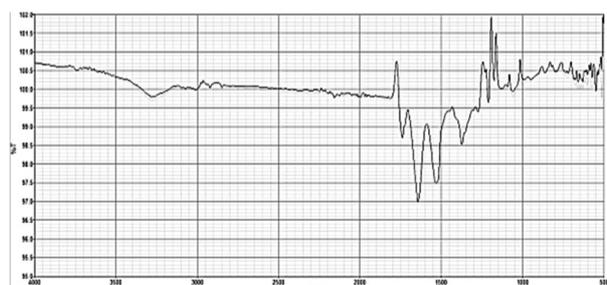
เซรีซินที่ปนอยู่ในส่วนประกอบของรังไหม จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วต้มในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้นในสภาวะเดียวกัน 2 ครั้ง แล้วทำการอบเส้นไหมในตูบลมร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้เส้นใยไฟโบรอินที่แห้งและบริสุทธิ์ จากนั้นละลายเส้นใยไฟโบรอินในสารละลาย Ternary Solvent อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส แล้วละลายใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ชั่วโมง หลังจากนั้นบรรจุสารละลายลงใน Cellulose Tube แล้วแช่ในน้ำปราศจากไอออน ทำการเปลี่ยนน้ำใหม่ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำสารละลายมาหมุนเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใสกับตะกอน [16] จากนั้นนำสารละลายส่วนใสบรรจุใน Wells Plate เพื่อรอทำการขึ้นรูปต่อไป

2) กระบวนการเตรียมโคโตซาน

กระบวนการเตรียมโคโตซานจากแกนหมึก โดยการนำโคโตซาน (92% Deacetylation degree) แช่ในกรดแอสซิดิก เป็นเวลา 3 วัน จนกลายเป็นเนื้อสารละลาย เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในการขึ้นรูปชิ้นงาน

3.2 ตรวจสอบคุณลักษณะของสารตั้งต้นที่สังเคราะห์

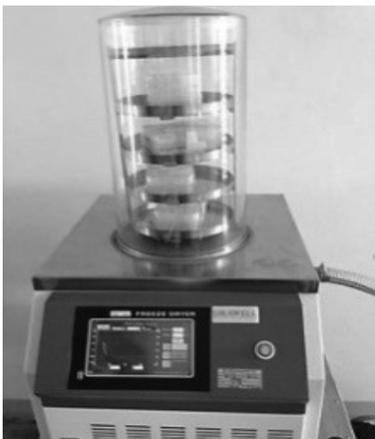
ทำการตรวจสอบยืนยันผลการสังเคราะห์ไฟโบรอินจากรังไหมด้วยกระบวนการ Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR) ดังปรากฏในรูปที่ 1 พบว่าเฟสองค์ประกอบของไฟโบรอินที่ทำการสังเคราะห์มีการดูดกลืนคลื่นแสงอยู่ในช่วงเดียวกันกับการดูดกลืนคลื่นแสงของกรดอะมิโนในโปรตีนไฟโบรอินที่ 1637.7 cm⁻¹ (Amide I (C=O Stretching)), 1514.3 cm⁻¹ (Amide II (N-H Bending)) และ 1234.1 cm⁻¹ (Amide III (C-N Stretching)) [17] ดังนั้นจึงสามารถยืนยันได้ว่าไฟโบรอินที่สังเคราะห์ขึ้นจากรังไหมนั้นเป็นไฟโบรอินจริง



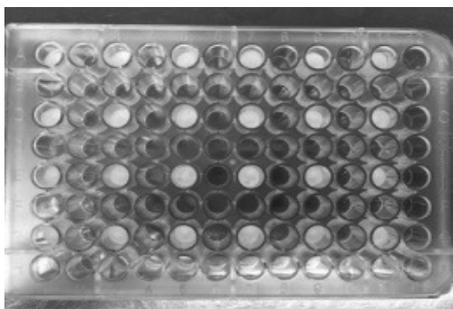
รูปที่ 1 ผล FTIR ของไฟโบรอินที่สังเคราะห์

3.3 ขั้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

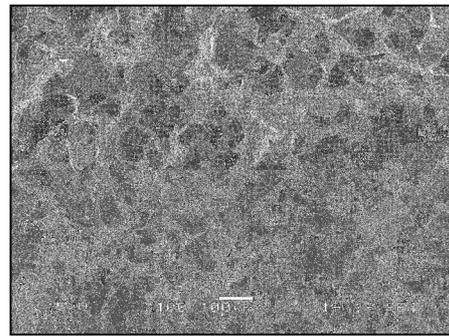
ทำการขึ้นรูปเป็นโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ โดยสังเคราะห์จากโคโตซาน 50 เปอร์เซ็นต์ต่อไฟโบรอิน 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในจานหลุม 96 หลุม (96-Well tissue culture plate) จากนั้นนำไปทำให้แห้ง โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งคืน ก่อนนำไปใส่เครื่อง Lyophilizer ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง [15] ดังรูปที่ 2 เพื่อให้แห้ง กำจัดน้ำ และทำให้เกิดรูพรุนบนชิ้นงาน ภายใต้ความเย็นและสุญญากาศ โดยชิ้นงานหลังผ่านกระบวนการทำแห้งที่ใช้ในการทดลองนี้ แสดงดังรูปที่ 3 ซึ่งเมื่อนำชิ้นงานไปทำการตรวจสอบลักษณะโครงร่างพรุนด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) จะปรากฏโครงสร้าง ดังรูปที่ 4



รูปที่ 2 การขึ้นรูปโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยเครื่อง Lyophilizer



รูปที่ 3 ชิ้นงานโครงเลี้ยงเซลล์ด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง



รูปที่ 4 ลักษณะรูพรุนของโครงเลี้ยงเซลล์ภายใต้ SEM

3.4 การเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อน (Chondrosarcoma SW1353) จากวิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเพาะเลี้ยงใน T.C. Flask filter Cap ด้วย Complete DMEM 10 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแยกเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนทุก 3 วัน โดยการเติม GIBCO® Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1 มิลลิลิตรเพื่อชะล้างโปรตีนของเซลล์ จากนั้นเติมเอนไซม์ Trypsin-EDTA 2.5 มิลลิลิตร แล้วบ่มในตู้บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 นาที นำขวดเพาะเลี้ยงเซลล์มาส่งกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์หลุดออกจากผิวขวดหรือไม่ เมื่อตรวจสอบว่าเซลล์หลุดออกจากผิวขวดแล้วจึงเติมสาร Trypsin inhibitor 2.5 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin-EDTA จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายออกจากเซลล์ ด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนใสทิ้ง เติม Complete DMEM 2 มิลลิลิตร แบ่ง cell suspension 10 ไมโครลิตรใส่ลงใน trypan blue stain 250 ไมโครลิตรเพื่อย้อมสีเซลล์ นับเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนด้วย Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจากวัสดุชีวภาพ 4,000 เซลล์ต่อหลุม โดยใช้จานหลุม 96 หลุม (96-well tissue culture plate) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติจากวัสดุชีวภาพผ่านการฆ่าเชื้อโดยฉายแสง Ultra violet เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นแช่โครงเลี้ยงเซลล์ใน Complete media ที่มีส่วนผสมของสารปฏิชีวนะ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง [18]

4. ปฏิบัติการทดลองการทรีตเมนต์พลาสมา

ทำการเตรียมพื้นที่และเครื่องมือในการปฏิบัติการทดลองการทรีตเมนต์พลาสมาให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ โดยใช้แสง Ultra violet ก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 45-60 นาที แล้วจึงทำการทดลองทรีตเมนต์พลาสมาดังรูปที่ 5 ตามปัจจัยและระดับในการทดลองดังตารางที่ 1 จากการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล โดยจะทำการทดลองทรีตเมนต์พลาสมาแต่ละการทดลองซ้ำ 6 ครั้ง



รูปที่ 5 การทดลองการทรีตเมนต์พลาสมาด้วยเซลล์มะเร็งกระดุกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ

5. ทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์

ทดสอบความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) หลังการทรีตเมนต์พลาสมา 24 ชั่วโมง [18] โดยเติม MTT 20 μl (5 mgml^{-1} PBS) ในแต่ละ well plate เมื่อ MTT ถูก reduced ด้วย mitochondrial reductase จะทำให้สีของ MTT เปลี่ยนเป็นสีม่วงของสี formazan บ่มในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย DMSO 200 μL เพื่อละลาย MTT-formazan complex หาค่า absorbance จากเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 630-540 nm ดังรูปที่ 6 นำค่า Optical density (OD) คำนวณเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์



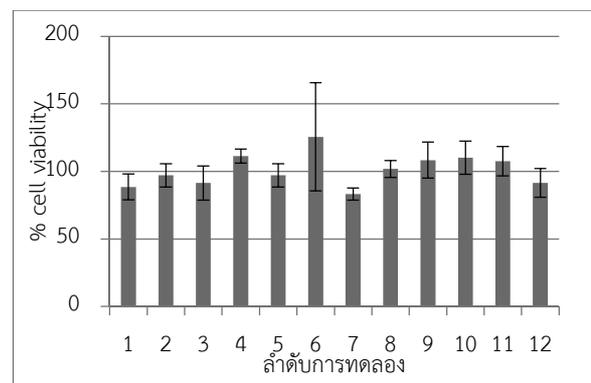
รูปที่ 6 หาค่า Absorbance จากเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 630-540 nm

6. ผลการทดลองและการอภิปรายผล

จากงานวิจัยได้ทำการทดสอบการรักษามะเร็งด้วยพลาสมาเย็น ผลทดสอบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ในการใช้พลาสมาทรีตเมนต์เซลล์มะเร็งกระดุกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ แสดงดังตารางที่ 2 และรูปที่ 7

จากผลการทดลองพบว่า การทดลองที่ 7 ทำให้ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์น้อยที่สุดเท่ากับ 83.33 ซึ่งก็คือปัจจัยที่เวลา 30 วินาที ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอน 30 มิลลิตรต่อนาที และกำลังพลาสมา 30 วัตต์

จากการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab เมื่อพิจารณาค่า P-Value ของแต่ละปัจจัยที่มีค่าน้อยกว่าค่าของ Alpha ($\alpha=0.05$) พบว่าเทอมของผลกระทบหลักที่มีนัยสำคัญต่อเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระดุกอ่อน คือ เวลา (A) ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอน (B) และกำลังพลาสมา (C) ส่วนผลกระทบร่วมระหว่างปัจจัยที่มีนัยสำคัญได้แก่ AC BC และ ABC ส่วนผลกระทบอื่นๆ ไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญ



รูปที่ 7 กราฟผลทดสอบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ในการใช้พลาสมาทรีตเมนต์เซลล์มะเร็งกระดุกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติ

การทดสอบค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R-Square) ของค่าผลตอบจากข้อมูลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบจากตารางที่ 3 สามารถนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเพื่อใช้วิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของแบบจำลองโดยพิจารณาจากค่าของ R^2 ที่ได้พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ในการตัดสินใจของผลทดสอบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนที่ 99.77 เปอร์เซ็นต์ และหลัง R^2 ได้รับการปรับค่าแล้วมีค่าเท่ากับ 98.85 เปอร์เซ็นต์ซึ่งถือเป็นค่าที่ใช้ได้

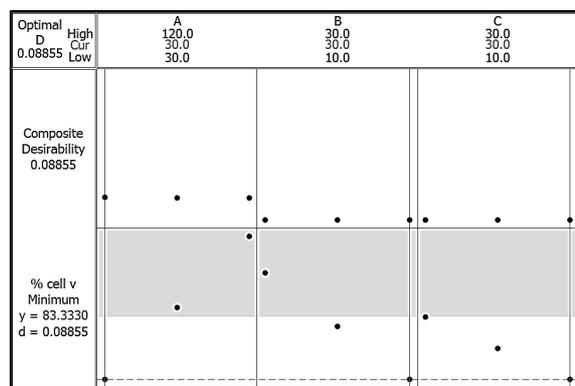
ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของผลทดสอบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียล

Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		99.549	0.4603	216.25	0.000
A	18.929	9.464	0.4603	20.56	0.002
B	-5.085	-2.542	0.4603	-5.52	0.031
C	4.847	2.423	0.4603	5.26	0.034
A*B	0.323	0.162	0.4603	0.35	0.759
A*C	4.609	2.304	0.4603	5.01	0.038
B*C	-13.691	-6.845	0.4603	-14.87	0.004
A*B*C	-5.357	-2.678	0.4603	-5.82	0.028
Ct Pt		9.135	0.8815	10.36	0.009

S = 1.30207 PRESS = *
R-Sq = 99.77% R-Sq(pred) = *% R-Sq(adj) = 98.85%

จากการวิเคราะห์ส่วนตกค้างของข้อมูล ซึ่งผลตอบของการทดลองพบว่าความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง (Normal Probability Plot of the Residuals) มีแนวโน้มไม่เป็นเส้นตรงและมีไม่มีการกระจายตัวแบบปกติ การกระจายตัวของส่วนตกค้างของข้อมูลที่ไม่มีความกระจัดกระจายและมีแนวโน้มที่ชัดเจนทำให้สามารถสรุปได้ว่าส่วนตกค้างของข้อมูลไม่มีการกระจายตัวแบบอิสระ และจากส่วนตกค้างของข้อมูลกับลำดับการทดลอง พบว่าจุดของข้อมูลบนกราฟมีแนวโน้มที่ชัดเจน สามารถสรุปได้ว่าส่วนตกค้างของผลตอบไม่มีลักษณะการกระจายตัวแบบอิสระ จากการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อให้ได้ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้ฟังก์ชัน Response Optimization สามารถสรุปว่าลักษณะที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัยในการลดเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนพบว่า การทรีตเมนต์พลาสมาเย็นเวลา 30 วินาที ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอน 30 มิลลิลิตรต่อนาที และการใช้กำลังพลาสมา 30 วัตต์ จะส่งผลให้ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนเท่ากับ 83.33 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า desirability เท่ากับ 0.088550 ซึ่งค่า desirability ที่ต่ำสะท้อนให้เห็นว่าการวิเคราะห์จุดที่

เหมาะสมด้วยพื้นผิวผลตอบนั้นไม่มีนัยสำคัญ ดังรูปที่ 8 พลาสมาไม่สามารถลดจำนวนของเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติได้ อาจเนื่องจากโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติที่ใช้ในการศึกษามีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นพลาสมาจึงไม่สามารถทะลุทะลวงลงไปได้ อีกทั้งโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติมีส่วนประกอบของโคโตซานซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างของหมู่อะมิโน ที่มีสมบัติของประจุบวก (Cation) ทำให้มีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ -OH radical [19] ซึ่ง -OH radical จากพลาสมาเย็นเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายของ DNA นำไปสู่การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นโครงสร้างของโคโตซานที่เป็นส่วนประกอบของโครงเลี้ยงเซลล์จึงมีสมบัติในการทำปฏิกิริยากับ -OH radical ที่เกิดจากกระบวนการพลาสมาทำให้เซลล์มะเร็งได้รับผลกระทบจากพลาสมา น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้พลาสมาเย็นกับเซลล์มะเร็งในระดับ 2 มิติ จากงานวิจัยของ Zhang และคณะในปี 2008 ได้ศึกษาผลกระทบของเจ็ทพลาสมาต่อเซลล์มะเร็ง พบว่าพบว่าเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [20]



รูปที่ 8 กราฟแสดงจุดที่เหมาะสมที่สุดของแต่ละปัจจัย

7. สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการรักษามะเร็งกระดูกอ่อนบนโครงเลี้ยงเซลล์แบบสามมิติที่สังเคราะห์จากไฟโบรอินและโคโตซานด้วยพลาสมาเย็น โดยใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลที่ซึ่งประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ เวลา (วินาที) ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอน (มิลลิลิตรต่อนาที) และ กำลังพลาสมา (วัตต์) ทำการทดลองตามที่ได้ออกแบบการทดลอง และทำการทดลองชุดควบคุมโดยไม่ทรีตเมนต์พลาสมา

จากผลการวิจัยที่ได้ทำการศึกษาหาเงื่อนไขที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยของพลาสมาเย็นที่ใช้ในการรักษามะเร็งกระดูกอ่อนในโครงเลี้ยงเซลล์ที่สังเคราะห์จาก

ไฟโบรอินและโคโตซานแบบสามมิติ พบว่าการทดลองโดยเงื่อนไขที่ 7 คือการเลือกปัจจัยที่เวลา 30 วินาที ปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ใช้ร่วมกับก๊าซอาร์กอน 30 มิลลิลิตรต่อนาที และกำลังพลาสมา 30 วัตต์ ทำให้ความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์น้อยที่สุดเท่ากับ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ในการตัดสินใจของผลการวิจัยมีความเพียงพอของแบบจำลอง (Model Adequacy Checking) อย่างไรก็ตามเมื่อมีการวิเคราะห์หาจุดที่เหมาะสมตามหลักการ Response Optimizer พบว่าค่า desirability เท่ากับ 0.088550 ซึ่งค่า desirability ที่ต่ำสะท้อนให้เห็นว่าการวิเคราะห์จุดที่เหมาะสมด้วยพื้นผิวผลตอบนั้นไม่มีนัยสำคัญจึงมีข้อสรุปว่าการใช้พลาสมาเย็นในช่วงปัจจัยที่ศึกษาจึงไม่สามารถลดจำนวนเซลล์มะเร็งกระดูกอ่อนในระดับสามมิติอย่างมีนัยสำคัญทั้งนี้อาจเนื่องจากโครงสร้างเซลล์แบบสามมิติที่ใช้ในการศึกษามีโครงสร้างที่ซับซ้อนขึ้นพลาสมาจึงไม่สามารถทะลุทะลวงลงไปได้ นอกจากนี้โครงสร้างเซลล์ที่ใช้ในการจำลองโครงสร้างเนื้อเยื่อสามมิตินี้ มีส่วนประกอบเป็นโคโตซานที่มีประจุบวกซึ่งความสามารถทำปฏิกิริยาเชิงลบกับ -OH radical จากพลาสมา ทำให้เซลล์มะเร็งได้รับผลกระทบจากพลาสมา [19] จึงจำเป็นต้องทำวิจัยเพิ่มเติม เช่นการปรับวัสดุที่ไม่มีประจุบวกในการผลิตโครงสร้างเซลล์ การใช้เทคนิคพลาสมาอื่นๆ นอกจากนี้การปฏิบัติการทดลองที่เตรียมตัวพลาสมาควรเตรียมพื้นที่และเครื่องมือให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อ เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในการทดลอง และควรกำหนดตำแหน่งการฉายพลาสมาให้เหมาะสม กล่าวคือให้อยู่บริเวณจุดกึ่งกลางของงานเลี้ยงเซลล์เพื่อให้พลาสมากระจายตัวอย่างทั่วถึง

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบุคลากรจากหน่วยวิจัยเพื่อการออกแบบและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขั้นสูง ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ และ ศูนย์วิศวกรรมชีวการแพทย์ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และ ศูนย์วิจัยฟิสิกส์ของพลาสมาและลำอนุภาค ภาควิชาฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ เชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือ วัสดุดิบ และทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

9. เอกสารอ้างอิง

- [1] Health Statistics (2015). Public Health Statistic Bureau of Policy and Strategy. Bangkok: Samcharoen Panich Co., Ltd.
- [2] Hicks, R, F., (1999). Atmospheric-Pressure Plasma Cleaning of Contaminated Surfaces. Los Angeles: University of California, Los Angeles, 1-131. doi:10.2172/13662
- [3] Keidar, M., Shashurin, A., Volotskova, O., Stepp, M., & Srinivasan, P. (2013). Cold atmospheric plasma in cancer therapy. *Physics of Plasmas*, 20(5), 057101. doi:10.1063/1.4801516
- [4] Yan, D., Sherman, J, H., & Keidar, M. (2016). Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*, 8(9), 15977-15995. doi:10.18632/oncotarget.13304
- [5] Joh, H, M., Kim, S, J., Chung, T, H., & Leem, S, H., (2012). Reactive oxygen species-related plasma effects on the apoptosis of human bladder cancer cells in atmospheric pressure pulsed plasma jets. *Applied Physics Letters*, 101(5), 053703. doi:10.1063/1.4742742
- [6] Cooke, M, S., Evans, M, D., Dizdaroglu, M., & Lunce, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-214. doi:10.1096/fj.02-0752rev
- [7] Correia, C, R., Moreira-Teixeira, L, S., Moroni, L., Reis, R, L., van Blitterswijk, C, A., & Karperien, M. (2011). Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Mary Ann Liebert Inc*, 17(7), 717-30. doi:10.1089/ten.tec.2010.0467
- [8] Vepari, C., & Kaplan, D, L. (2007). Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci*, 32 (8-9), 991-1007. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013
- [9] Zhang, X., Cao, C., Ma, X., & Li, Y. (2011). Optimization of macroporous 3D silk fibroin scaffolds by salt-leaching procedure in organic solvent-free conditions. *J Mater Sci Mater Med*, 23(2), 315-24. doi:10.1007/s10856-011-4476-3
- [10] Unger, R, E., Sartoris, A., Peters, K., Motta, A., Migliaresi, C., Kunkel, M. (2007). Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-

- dimensional porous biomaterials. *Biomaterials*, 28(27), 3965-76. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.032
- [11] Yan, L, P., Oliveira, J, M., Oliveira, A, L., Caridade, S, G., Mano, J, F., & Reis, R, L. (2012). Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta Biomater*, 8(1), 289-301. doi:10.1016/j.actbio.2011.09.037
- [12] Chlapanidas, T., Farago, S., Mingotto, F., Crovato, F., Tosca, M, C., & Antonioli, B. (2011). Regenerated silk fibroin scaffold and infrapatellar adipose stromal vascular fraction as feeder-layer: a new product for cartilage advanced therapy. *Tissue Eng Part A*, 17(13-14), 1725-33. doi:10.1089/ten.TEA.2010.0636.
- [13] Bhardwaj, N., & Kundu, S, C. (2012). Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials*, 33(10), 2848-57. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.028
- [14] Dana, L., Nettles, D., Steven, H, E., & Jerome, A, G. (2004) Potential Use of Chitosan as a Cell Scaffold Material for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 8(6), 1009-1016. doi:10.1089/107632702320934100
- [15] Thunsiri, K., Udomsom, S., Wattanutchariya, W. (2015). Characteristic of Pore Structure and Cells Growth on the Various Ratio of Silk Fibroin and Hydroxyapatite in Chitosan Base Scaffold. *Key Engineering Materials*, 675-676(2016), 459-462. doi:0.4028/www.scientific.net/KEM.675-676.459
- [16] Damrongrungruang, T., Suwannakoot, J., & Maensiri, S. (2010). Study of fibroblast adhesion on RGDmodified electrospinning Thai silk fibroin nanofiber for scaffold material in dentistry. *A preliminary study Kerala Dental Journal*, 13 (2010), 3-14. Retrieved from <http://thailand.digitaljournals.org/index.php/KKUDJ/article/view/4576>
- [17] Wang, Li., & Chunzhong, Li. (2007). Preparation and physicochemical properties of a novel hydroxyapatite/chitosan-silk fibroin composite. *Carbohydrate Polymers*, 68.4 (2007), 740-745. doi:10.1002/jbm.a.34710
- [18] Kaushik, N, K., Kim, Y, H., Han, Y, G., & Choi, E, H., (2012). Effect of jet plasma on T98G human brain cancer cells. *Current Applied Physics*, 13 (2013), 614-618. doi:10.1016/j.cap.2012.10.009
- [19] Xie, W., Xu, P., & Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of a water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*, 11(2001), 1699-701. doi:10.1016/S0960-894X(01)00285-2
- [20] Zhang, X., Li, M., Zhou, R., Feng, K., & Yang, S. (2008). Ablation of liver cancer cells in vitro by a plasma needle. *Applied Physics Letters* 93, 021502(2008), 1-3. doi:10.1063/1.2959735

