



การใช้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตายของเซลล์กลัยโอบลาสโตมา

ประกายกานต์ วิจิตรธนบดี และ คมกฤต เล็กสกุล*

สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหการ ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ณัฐฐ์ปภาณ ยาวุฒิ

สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหการ ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหการ คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สำนักงานบริหารงานวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

นรพนธ์ วิเชียรสาร

ศูนย์สหวิทยาการศึกษาคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ธีรวรรณ บุญญวรรณ

สาขาวิชาฟิสิกส์และวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0 5394 4125 ต่อ 306 อีเมล: komgrit.lek@cmu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2025.05.001

รับเมื่อ 24 มกราคม 2568 แก้ไขเมื่อ 25 มีนาคม 2568 ตอบรับเมื่อ 21 เมษายน 2568 เผยแพร่ออนไลน์ 29 พฤษภาคม 2568

© 2025 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

เนื่องจากในปัจจุบันมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงเป็นมะเร็งที่มีความรุนแรงสูงและรักษายาก พบมากถึงร้อยละ 45 ของมะเร็งสมองทั้งหมด ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ทำการศึกษาหาแนวทางให้การรักษามะเร็งสมองชนิดร้ายแรงโดยงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการใช้พลาสมาเย็นเพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา โดยใช้เครื่องพลาสมาเจ็ทรุ่นไนติงเกลทำการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็ม ศึกษาปัจจัย 4 ปัจจัย ได้แก่ ระดับความเข้มข้นพลาสมา อัตราการไหลของอากาศ ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดกับผิวของมีเดีย และเวลาในการดิสชาร์จพลาสมา ผลการทดลองพบว่า พลาสมาเย็นสามารถกำจัดเซลล์มะเร็งได้สูงสุด 49.91% ภายใต้เงื่อนไขที่ดีที่สุด ระดับความเข้มข้นพลาสมา 0.62 วัตต์ อัตราการไหลของอากาศ 3 ลิตร/นาที ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดกับผิวของมีเดีย 2 เซนติเมตร และเวลา 210 วินาที จำนวนการตายของเซลล์ถูกตรวจวัดด้วยวิธีการย้อมสีไทแรนบลู และทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยการย้อมสารเรืองแสง (โพรพิดิอุมไอโอไดด์ และโซซสท์ 33342) และจากการทดลองในโครงร่าง 3 มิติ แสดงผลการกำจัดเซลล์มะเร็งได้สูงสุด 23.00% อย่างไรก็ตามพลาสมาเย็นมีศักยภาพในการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจนและไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการตายของเซลล์มะเร็ง งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการพัฒนาเทคโนโลยีพลาสมาเย็นเป็นวิธีการรักษามะเร็งสมองในอนาคต แต่ยังจำเป็นต้องศึกษาขั้นสูงเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพและการใช้งานในระดับคลินิกต่อไป

คำสำคัญ: พลาสมาเย็นในบรรยากาศ เซลล์มะเร็งสมองชนิดกลัยโอบลาสโตมา อนุมูลอิสระของออกซิเจนและไนโตรเจน การทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มจำนวน

การอ้างอิงบทความ: ประกายกานต์ วิจิตรธนบดี, คมกฤต เล็กสกุล, ณัฐฐ์ปภาณ ยาวุฒิ, นรพนธ์ วิเชียรสาร, และ ธีรวรรณ บุญญวรรณ, “การใช้เทคโนโลยีพลาสมาเย็นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตายของเซลล์กลัยโอบลาสโตมา,” วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, ปีที่ 35, ฉบับที่ 4, หน้า 1-13, เลขที่บทความ 254-017797, ต.ค.-ธ.ค. 2568.



Cold Atmospheric Plasma Technology for Enhancing Glioblastoma Cell Death

Prakaykan Wichitthanabodee and Komgrit Leksakul*

Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Natpaphan Yawut

Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Office of Research Administration, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Norrapon Vichiansan

Multidisciplinary center, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Dheerawan Boonyawan

Plasma and Beam Physics Research Facility, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 0 5394 4125 Ext. 306, E-mail: komgrit.lek@cmu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2025.05.001

Received 24 January 2025 ; Revised 25 March 2025 ; Accepted 21 April 2025; Published online: 29 May 2025

© 2025 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Currently, aggressive brain cancer is one of the most severe types of cancer and is difficult to treat. It accounts for up to 45% of all brain cancers. Therefore, the researcher aims to study and explore potential approaches for treating aggressive brain cancer. This study focuses on utilizing Cold Atmospheric Plasma (CAP) to eliminate glioblastoma cells (LN229), an aggressive form of brain cancer. The experiments employed the Cool Air Plasma Jet model Nightingale and implemented a Full Factorial Design (2^k) to investigate four factors: plasma intensity level, airflow rate, electrode-to-media surface distance, and plasma discharge duration. The findings revealed that cold plasma achieved a maximum cancer cell elimination rate of 49.91% under optimal conditions: plasma intensity at 0.62 watts, airflow rate at 3 liters per minute, electrode-to-media distance at 2 cm, and discharge time of 210 seconds. Cell death was quantified using trypan blue staining, while cell morphology was studied via fluorescence staining with propidium iodide and Hoechst 33342. In three-dimensional models, the maximum cancer cell elimination rate was 23.00%. The results suggest that cold plasma has significant potential in generating Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS), which contribute to cancer cell apoptosis. This research highlights the potential of cold plasma technology as a future treatment for brain cancer. However, further advanced studies are required to enhance its efficacy and applicability at the clinical level.

Keywords: Cold Atmospheric Plasma (CAP), Glioblastoma Cells (LN229), Reactive Oxygen and Nitrogen Species (RONS), Full Factorial Design

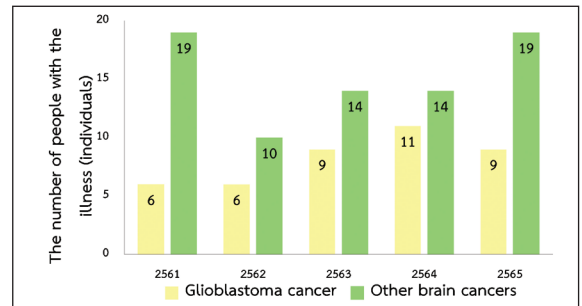
Please cite this article as: P. Wichitthanabodee, K. Leksakul, N. Yawut, N. Vichiansan, and D. Boonyawan, "Cold atmospheric plasma technology for enhancing glioblastoma cell death," *The Journal of KMUTNB*, vol. 35, no. 4, pp. 1–13, ID. 254-017797, Oct.–Dec. 2025 (in Thai).

1. บทนำ

ในปัจจุบันมะเร็งสมองชนิดร้ายแรง (Glioblastoma; GBM) เป็นมะเร็งที่ต้องใช้เทคนิคที่มีความแม่นยำในการรักษา และเป็นเนื้องอกที่ใช้เวลาในการวินิจฉัยเป็นเวลานาน จากข้อมูลของ นกสิทธ์ [1] เนื่องจากมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงนั้นมีข้อจำกัดและอาการที่ไม่แน่ชัดทำให้ยากต่อการวินิจฉัย โดยมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงเป็นมะเร็งที่มีความรุนแรงในระดับสูงสุดที่องค์กรอนามัยโลกได้จัดอันดับไว้ และจากงานวิจัยของจากริญญ และคณะ [2] พบว่า มีผู้ป่วยมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงมากถึงร้อยละ 45 ของมะเร็งสมองทั้งหมด โดยสามารถแสดงข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งเทียบกับมะเร็งสมองชนิดร้ายแรง 5 ปี ซึ่งเป็นข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติของประเทศไทย พ.ศ. 2561-2565 [3]-[7] โดยสามารถแสดงได้ดังรูปที่ 1

ผู้ที่ป่วยเป็นมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงนั้นมีโอกาสรอดหลังการรักษาและใช้เวลาบำบัดเฉลี่ย 14 เดือน และในปัจจุบันนี้มีวิธีการรักษาหลัก 3 วิธีการ ได้แก่ การทำเคมี การผ่าตัด และการฉายรังสี แต่มะเร็งสมองชนิดร้ายแรงนั้นยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิธีการรักษามะเร็งสมองที่หลากหลายมากขึ้น เช่น จากงานวิจัยของณัฐธิยา [8] ได้มีการใช้เซลล์ในการรักษา (T-Cell Therapy) โดยจะนำเลือดของผู้ป่วยมาแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด T-Cell มาตัดแปลงโดยนำโปรตีนบนผิวมะเร็งมาทำเป็นตัวเป้าหมายเพื่อให้ T-Cell จดจำเซลล์มะเร็งและส่งกลับเข้าสู่ร่างกายผู้ป่วยเพื่อนำไปทำลายเซลล์มะเร็ง แต่ยังพบข้อจำกัดด้านเวลาจากการเพาะเลี้ยงซึ่งใช้เวลานานและคาดการณ์เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่ได้

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะทำการศึกษหาแนวทางในการรักษามะเร็งสมองชนิดร้ายแรง และงานวิจัยของ Kazemi และคณะ [9] ได้มีการนำเทคโนโลยีพลาสมาเย็นที่ถูกสร้างขึ้นจากการไอออไนซ์ (Ionization) ของอะตอมโดยทั่วไปจะเกิดจากสนามไฟฟ้า โดยมีการประยุกต์นำเทคโนโลยีพลาสมาเย็นมาทำการสร้างเป็นพลาสมาแอคทีเวตในมีเดีย (Plasma Activated Medium; PAM) ในการรักษาเซลล์มะเร็งส่งผลให้ออกซิเจนในมะเร็งมีมากเกินไปทำให้การทำงานของมะเร็งผิดปกติ ดังงานวิจัยของ Tanaka และคณะ [10]



รูปที่ 1 ข้อมูลผู้ป่วยมะเร็งสมองเทียบกับมะเร็งสมองชนิดร้ายแรง 5 ปี ของประเทศไทย [3]-[7]

ได้มีการนำพลาสมาเจ้ทมาใช้ในการสร้างพลาสมาแอคทีเวตในมีเดีย ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจนและไนโตรเจน (Reactive Oxygen and Nitrogen Species; RONS) ซึ่งมีความสามารถในการทำให้เซลล์มะเร็งทำงานผิดปกติและอ่อนแอลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bauer และคณะ [11] และ Srinivas และคณะ [12] ได้มีการสร้างพลาสมาก่อให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจนและไนโตรเจนใช้ร่วมกับการบำบัดด้วยยีนที่เป็นพิษต่อมะเร็ง และงานวิจัยของ Yan และคณะ [13] ได้ทำการการรักษาเซลล์มะเร็งเต้านมโดยใช้ PAM อธิบายทางกลไกว่าสารออกฤทธิ์กระจายตัวและส่งสัญญาณและขยายสัญญาณการตายของเซลล์ในของเหลว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของอชิป [14] และ Phaniendra และคณะ [15] โดยในงานวิจัยกขกร และคณะ [16] แสดงให้เห็นว่าพลาสมาสามารถใช้ในการกำจัดเซลล์มะเร็ง โดยไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ปกติข้างเคียง อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้พลาสมาจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย กำลังพลาสมา ปริมาณก๊าซ และเวลาสำหรับการทรีตเมนต์ ดังงานวิจัยของ กขกร และคณะ [16] ได้นำเทคนิคการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลในการวิเคราะห์ปัจจัยที่เหมาะสมในการสร้างอนุมูลอิสระที่เหมาะสมในการกำจัดเซลล์มะเร็ง และในงานวิจัยของ Körtzer และคณะ [17] ได้มีการใช้พลาสมาในบรรยากาศแบบเย็น (Cold Atmospheric Plasma; CAP) เพื่อทำการรักษาร่วมกับการรักษาด้วยเทโมโซโลไมด์ (TMZ) การรักษาพร้อมกันนำไปสู่การยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง (GBM) ซึ่ง

เป็นการทดลองในอาหารเลี้ยงเซลล์และทำการทดลองร่วมกับการรักษาด้วยยา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Privat-Maldonado และคณะ [18] ซึ่งทำการทดลองรักษาเซลล์มะเร็งโดยใช้ยา ออราโนฟิน (Auranofin) ในการรักษาร่วมกับพลาสมาในบรรยากาศแบบเย็น (CAP)

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาแนวทางในกระตุนการตายของเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง ด้วยเครื่องพลาสมาจากอากาศบำบัดรุ่นไนติงเกล (The Cool Air Plasma Jet Model Nightingale) ในการกระตุ้นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง โดยทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งสมองในอาหารเลี้ยงเซลล์ (Medium) หลังจากนั้นทำการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง โดยพลาสมาจากอากาศบำบัดรุ่นไนติงเกล โดยนอกจากการทดลองในอาหารเลี้ยงเซลล์แล้วในงานวิจัยนี้ ได้มีการสร้างโครงร่างสามมิติในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อจำลองสภาพแวดล้อมที่มีความซับซ้อน เพื่อให้ใกล้เคียงกับร่างกายมนุษย์มากขึ้นช่วยให้สามารถประเมินศักยภาพของพลาสมาในบริบทที่ใกล้เคียงกับสภาวะจริงมากยิ่งขึ้น และเพื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมในรูปแบบสามมิติ โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ คือ เพื่อใช้เทคโนโลยีอาหารเลี้ยงเซลล์กระตุ้นพลาสมาในการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง และเพื่อสร้างสมการในการหาค่าเงื่อนไขที่เหมาะสมกับความสัมพันธ์ของการใช้เทคโนโลยีอาหารเลี้ยงเซลล์กระตุ้นพลาสมา เพื่อกำจัดเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบเต็มจำนวน ซึ่งงานวิจัยนี้มีความประสงค์ที่จะเป็นงานวิจัยอีกหนึ่งงานวิจัยที่ช่วยสร้างความเข้าใจในการนำพลาสมาเจ้ทมาใช้ในการกำจัดมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงในหลอดทดลอง และใช้เป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์กระตุ้นพลาสมา

2. วิธีการทดลอง

2.1 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Cell Culture)

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง (LN229 Cell

Line) ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ของมะเร็งสมองบริเวณเยื่อหุ้มสมองส่วนหน้าข้างขวาของเพศหญิง อายุ 60 ปี (PACIFIC SCIENCE, Elabscience Biotechnology, สหรัฐอเมริกา)

เซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (Flask) ที่บรรจุ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) ผสม Fetal Bovine Serum (FBS) ในสัดส่วน 5% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยง (Medium) สำหรับเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง โดยเซลล์จะถูกบ่มในตู้ปลอดเชื้อ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณ CO₂ 5% (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา)

เมื่อเซลล์มีความหนาแน่นอยู่ที่ประมาณ 70–80% ของพื้นที่ ซึ่งทำการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์จะถูกแยก (Subculture) ไปยังภาชนะเพาะเลี้ยงใหม่ ทำการแยกเซลล์ออกจากพื้นผิวขวดเพาะเลี้ยง โดยการเติม 0.25% Trypsin (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) เพื่อขจัดเศษอาหารเลี้ยงที่เหลืออยู่ แล้วจึงย้ายเซลล์ไปยังจานเพาะเซลล์ 12 หลุม (ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อหลุม) และเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM + FBS 5%) ใหม่ลงในจานเพาะเซลล์ 12 หลุม (12 Well Plate) (ปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อหลุม) หลังจากนั้นจานเพาะเซลล์ 12 หลุม จะถูกบ่มในตู้ปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณ CO₂ 5%

2.2 กระบวนการออกแบบการทดลอง เพื่อยับยั้งเซลล์มะเร็งด้วยพลาสมา

ใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มจำนวน เนื่องจากเป็นวิธีที่ช่วยให้สามารถศึกษาผลกระทบของทุกตัวแปรที่สนใจได้อย่างครอบคลุม ทั้งในแง่ของผลกระทบหลักและปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรแต่ละคู่ นอกจากนี้ยังช่วยให้เข้าใจเงื่อนไขที่ส่งผลต่อการทดลองได้อย่างละเอียด

ซึ่งสอดคล้องกับแนวทางที่ Montgomery และคณะ [19] ได้นำเสนอ โดยระบุปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างอาหารเลี้ยงเซลล์กระตุ้นพลาสมา เพื่อหาเงื่อนไขในการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งเหมาะสมที่สุด โดยทำการทดลองที่จุดกึ่งกลาง (0) 5 ชั่วโมง และทำการทดลองที่ปัจจัย 4 ปัจจัย 2 ระดับ (-1) และ (+1) ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง มีการทดลองทั้งหมด 37 การทดลอง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับในการทดลอง

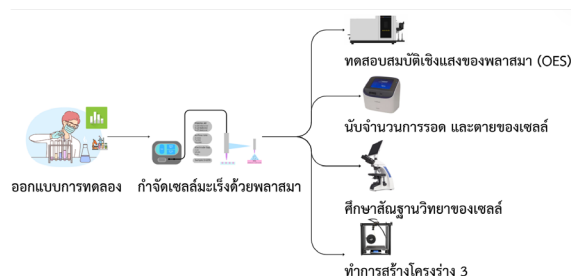
ปัจจัยในการทดลอง	ระดับของปัจจัย			ตัวแปร
	ต่ำ (-1)	กลาง (0)	สูง (+1)	
ระดับความเข้มข้นพลาสมา (วัตต์)	0.28	0.43	0.62	A
อัตราการไหลของอากาศ (ลิตรต่อนาที)	3	5	7	B
ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดกับผิวของมีเดีย (เซนติเมตร)	1	1.5	2	C
เวลาในการดิสชาร์จพลาสมา (วินาที)	90	150	210	D

หลังจากบ่มเพาะเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเซลล์ทั้ง 12 หลุม จากนั้นทำการกระตุ้นการตายของเซลล์โดยใช้พลาสมาตามเงื่อนไขที่ได้ทำการออกแบบในตารางที่ 1 โดยพลาสมาจากอากาศบำบัดร้อนในตึงเกล เป็นพลาสมาเจ็ตที่ออกแบบมาสำหรับการทดลองในห้องปฏิบัติการ โดยทำงานผ่านการควบคุมอัตราการไหลของอากาศ ซึ่งไหลผ่านอิเล็กโทรดที่อยู่ภายใต้แรงดันไฟฟ้าสูง ส่งผลให้โมเลกุลในอากาศเกิดการแตกตัวและก่อตัวเป็นพลาสมา โดยระดับความเข้มข้นของพลาสมาสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามเงื่อนไขของการทดลองและนำมาใช้ในการสร้างพลาสมาแอคทีเวตในมีเดีย ซึ่งจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระของออกซิเจนและไนโตรเจน ดังรูปที่ 2

เมื่อได้เงื่อนไขการทดลองที่ดีที่สุดแล้วจะทำการยืนยันผลการทดลองทั้งหมด 5 ชั่วโมง ในเงื่อนไขที่ดีที่สุดโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในงานเพาะเซลล์ 12 หลุม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 เครื่องพลาสมาจากอากาศบำบัดร้อนในตึงเกล



รูปที่ 3 ขั้นตอนในการทดลองและยืนยันผลการทดลอง

โดยมีขั้นตอนในการทดลอง และขั้นตอนในการยืนยันผลการทดลอง ดังรูปที่ 3

2.3 ทำการทดสอบสมบัติเชิงแสงของพลาสมา (Optical Emission Spectroscopy; OES)

ทำการทดสอบสมบัติเชิงแสงของพลาสมาในเงื่อนไขการทดลองที่ดีที่สุดด้วยเทคนิคการวิเคราะห์สเปกโตรสโกปีทางเคมี รุ่น AvaSpec 2048 ซึ่งเป็นสเปกโตรมิเตอร์ใยแก้วนำแสงขนาดเล็ก (Avante, ประเทศเนเธอร์แลนด์) เพื่อระบุชนิดของพลาสมาที่เกิดปฏิกิริยาบนพื้นผิวแสดงผลเป็นความยาวคลื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ นรพนธ์ และคณะ [20] ซึ่งผลลัพธ์ได้จะทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม AvaSoft โดยได้บันทึกสเปกตรัมการปล่อยแสงในช่วงความยาวคลื่น 200–800 นาโน

2.4 ทำการนับจำนวนการรอด และตายของเซลล์

เมื่อทำการกระตุ้นการตายของเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรงด้วยพลาสมาแล้วจากนั้นทำการย้อมเซลล์ด้วย Trypan Blue (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) โดยผสมเซลล์มะเร็งปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ Trypan Blue ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้น

ส่วนผสมที่ได้จะถูกนำไปใส่สไลด์ Countess Cell Counting Chamber Slides (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ Invitrogen® Countess® 3/3 FL Automated Cell Counter (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ จะทำการวิเคราะห์ และแสดงผลจำนวนเซลล์ทั้งหมด รวมถึงจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเซลล์ที่ตาย ผลการทดลองได้รับการบันทึกในรูปแบบเชิงปริมาณ โดยใช้ค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตและเซลล์ที่ตาย

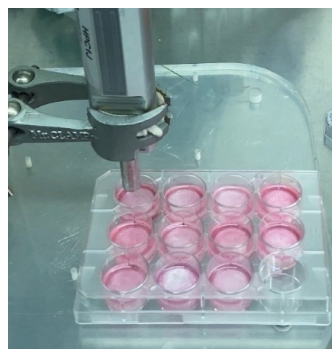
2.5 ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์

เซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรงได้รับการกระตุ้นด้วยพลาสมาที่เงื่อนไขที่ดีที่สุดและบ่มที่ตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยใช้สารโพธิ์เดียมไอโอไดด์ (PI) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) และ Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, สหรัฐอเมริกา) เพื่อตรวจเซลล์ที่มีชีวิต และเซลล์ที่ตาย ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะเปล่งแสงสีน้ำเงินจากการย้อมด้วย Hoechst 33342 ส่วนเซลล์ที่ตายจะเปล่งแสงสีแดงจากการย้อมด้วย PI

เริ่มจากการเตรียมสารย้อม โดยผสม PI และ Hoechst 33342 ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง (Ultrapure water) หลังจากนั้นนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในจานเพาะ 6 หลุม ล้างด้วย PBS จากนั้นเติมสารย้อม PI และ Hoechst ที่เตรียมไว้ลงไปในแต่ละหลุมบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นดูดสารย้อมทิ้งและทำการคงรูปเซลล์โดยการเติมสาร Paraformaldehyde 100 ไมโครลิตร เพื่อรักษารูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ จากนั้นทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์

2.6 ทำการยืนยันผลการทดลอง โดยการสร้างโครงร่าง 3 มิติ เปรียบเทียบกับการทดลองในอาหารเลี้ยงเซลล์

สร้างโครงร่าง 3 มิติ โดยใช้เครื่องพิมพ์ 3D Crealty



รูปที่ 4 เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในโครงร่าง 3 มิติ

Ender-5 Plus (Crealty, ประเทศจีน) จากวัสดุพลาสติกชีวภาพ (Polylactic Acid; PLA) ชนิด eSUN PLA 3D Printer 1.75 clear พิมพ์ด้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12.5 มิลลิเมตร และสูง 6.5 มิลลิเมตร และมีความหนาแน่นของรูปพรุน 40% การออกแบบใช้โปรแกรม FreeCAD 0.20 และการพิมพ์มีการควบคุมอุณหภูมิที่หัวฉีด 220 องศาและแผ่นพิมพ์ที่ 60 องศา หลังจากการพิมพ์โครงร่าง 3 มิติ ได้ทำการฆ่าเชื้อด้วยการฉายรังสี UV 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดลองในเงื่อนไขที่ดีที่สุดและบ่มที่ตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในโครงร่าง 3 มิติ ดังรูปที่ 4 เพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในมีเดีย

3. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

3.1 ผลการทดลองจากการใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ ผลการทดลอง

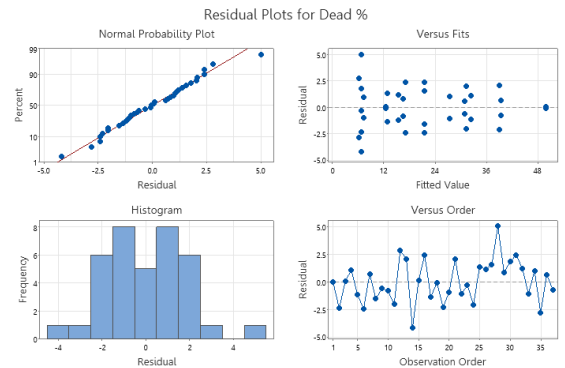
ผลการทดลองจากการใช้เครื่องนับเซลล์อัตโนมัติ แสดงข้อมูลจำนวนการตายและการรอดของเซลล์มะเร็งสมอง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลจำนวนการตายและการรอดของเซลล์มะเร็งสมอง

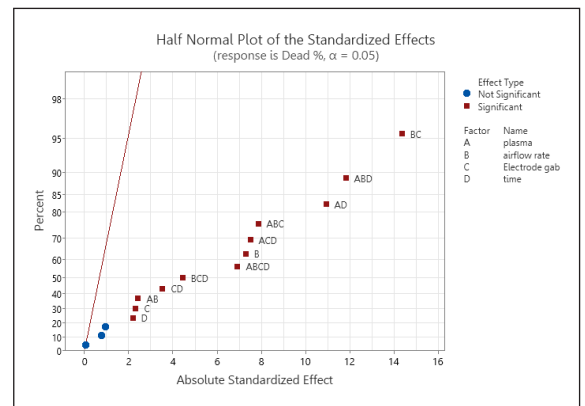
ลำดับ	A (วัตต์)	B (ลิตร/นาที)	C (เซนติเมตร)	D (วินาที)	เปอร์เซ็นต์การตาย
1	0.28	3	1.0	210	12.40
2	0.28	3	1.0	90	14.67

ตารางที่ 2 ข้อมูลจำนวนการตายและการรอดของเซลล์
มะเร็งสมอง (ต่อ)

ลำดับ	A (วัตต์)	B (ลิตร/นาท)	C (เซนติเมตร)	D (วินาที)	เปอร์เซ็นต์ การตาย
3	0.28	3	1.0	210	12.50
4	0.28	7	1.0	210	28.39
5	0.62	3	2.0	90	14.27
6	0.28	7	2.0	90	19.15
7	0.28	3	2.0	90	40.28
8	0.62	7	2.0	210	20.00
9	0.28	7	2.0	210	30.26
10	0.62	3	1.0	210	15.73
11	0.28	7	1.0	90	29.16
12	0.62	3	1.0	90	9.10
13	0.62	7	1.0	90	41.01
14	0.43	5	1.5	150	2.63
15	0.62	3	2.0	210	50.00
16	0.28	3	1.0	90	19.49
17	0.62	7	2.0	90	11.45
18	0.62	3	2.0	210	49.81
19	0.43	5	1.5	150	4.51
20	0.28	3	2.0	210	6.38
21	0.28	7	1.0	90	33.25
22	0.62	7	1.0	210	31.27
23	0.43	5	1.5	150	6.48
24	0.62	7	1.0	90	36.89
25	0.62	7	2.0	90	14.17
26	0.62	7	1.0	210	33.52
27	0.62	7	2.0	210	23.09
28	0.43	5	1.5	150	11.82
29	0.62	3	1.0	210	17.40
30	0.43	5	1.5	150	8.60
31	0.28	7	2.0	90	23.97
32	0.62	3	2.0	90	16.66
33	0.28	7	1.0	210	26.26
34	0.28	3	2.0	210	8.32
35	0.62	3	1.0	90	3.50
36	0.28	7	2.0	210	31.50
37	0.28	3	2.0	90	38.65



รูปที่ 5 กราฟ Residual Plots



รูปที่ 6 กราฟ Half Normal Plot

จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้โปรแกรมมินิแทป (Minitab 21) ดังรูปที่ 5 กราฟ Residual Plots

กราฟ Residual Plots แสดงข้อมูลโมเดลว่าสามารถคาดการณ์เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็งได้อย่างเหมาะสม เนื่องจาก Normal Probability Plot และ Histogram และไม่มีรูปแบบหรือแนวโน้มใน Residual และจาก Versus Fits และ Versus Order แสดงให้เห็นว่าโมเดลไม่มีความลำเอียง (Bias) ที่เกิดขึ้นในผลลัพธ์ของการวิเคราะห์หรือการทำนายจากโมเดล

ตารางที่ 3 แสดงค่าทางสถิติ p -value ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่นัยสำคัญ 0.05 ผลจากการทดสอบพบว่า ปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบ คือ อัตราการไหลของอากาศ (B) ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดกับผิวของ (C) และเวลาในการ

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์จากโปรแกรมมินิแทป 21

Term	Effect	Coef	SE Coef	T-Value	p-value
Constant		23.822	0.447	53.240	0.000
plasma	0.841	0.421	0.447	0.940	0.358
Airflow rate	6.524	3.262	0.447	7.290	0.000
Electrode gap	2.076	1.038	0.447	2.320	0.031
time	1.960	0.98	0.447	2.190	0.041
plasma*Airflow rate	-2.157	-1.079	0.447	-2.410	0.026
plasma*Electrode gap	-0.698	-0.349	0.447	-0.780	0.445
plasma*time	9.762	4.881	0.447	10.910	0.000
Airflow rate*Electrode gap	-12.847	-6.424	0.447	-14.360	0.000
Airflow rate*time	-0.056	-0.028	0.447	-0.060	0.951
Electrode gap*time	3.160	1.58	0.447	3.530	0.002
plasma*Airflow rate*Electrode gap	-7.027	-3.513	0.447	-7.850	0.000
plasma*Airflow rate*time	-10.576	-5.288	0.447	-11.820	0.000
plasma*Electrode gap*time	6.703	3.352	0.447	7.490	0.000
Airflow rate*Electrode gap*time	3.963	1.981	0.447	4.430	0.000
plasma*Airflow rate*Electrode gap*time	-6.184	-3.092	0.447	-6.910	0.000
Curvature	1	1251.75	1251.75	195.38	0.000
Error	21.000	1379.880	65.710		
Lack-of-Fit	1.000	1251.750	1251.750	195.380	0.000
Pure Error	20.000	128.130	6.410		
R-sq = 97.89%; R-sq(adj) = 96.20%; R-sq(pred) = 93.62%.					

ดิสซาร์จพลาสมา (D) แต่ปัจจัยหลักที่ไม่ส่งผลต่อการทดลอง คือ ระดับความเข้มพลาสมา (A) และยังพบผลกระทบของ อันตรกิริยาปัจจัยที่ส่งผลต่อการทดลอง คือ BC, CD, AD, AB, ABD, ABC, ACD, BCD และ ABCD สอดคล้องกับรูปที่ 6 กราฟ Half Normal Plot ซึ่งปัจจัยของอันตรกิริยาที่ประกอบด้วย ระดับความเข้มพลาสมา (A) ส่งผลต่อการทดลอง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระดับความเข้มพลาสมา (A) ส่งผลต่อการทดลอง

จากการวิเคราะห์ในตารางที่ 3 พิจารณาค่า R^2 เพื่ออธิบายความผันแปรของค่าตัวแปรตอบสนอง แบบจำลองแบบเต็มจำนวน R^2 เท่ากับ 97.89% แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองแบบเต็มจำนวน นั้นสามารถทำนายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นกับตัวแปรตามได้ใกล้เคียงกับข้อมูลจริง และ R^2 (adj) เท่ากับ 96.20% ใช้ในการประเมินความ

แม่นยำของแบบจำลองสมการลดรูปเพื่อช่วยประเมินโมเดลได้อย่างมีค่า ในส่วนของค่า Lack-of-Fit มีนัยสำคัญอาจต้องทำการทดลองเพิ่มเติมในอนาคต สอดคล้องกับงานวิจัยของ นราศักดิ์ [21] ในส่วนของการควบคุมอุณหภูมิหรือสภาพแวดล้อมในการทดลอง และ Montgomery และคณะ [22] กล่าวว่าค่าสัมประสิทธิ์ (Coefficient) ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม แบบจำลองสมการเต็มจำนวน และแบบจำลองสมการลดรูปโดยแสดงดังสมการที่ (1) และ (2)

แบบจำลองแบบเต็มจำนวน (Regression Model)

เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็ง = $23.822 + 0.421A + 3.262B + 1.038C + 0.980D - 1.079AB -$

$$0.349AC + 4.881AD - 6.424BC - 0.028BD + 1.580CD - 3.513ABC - 5.288ABD + 3.352ACD + 1.981BCD - 3.092ABCD - 17.01Ct Pt \quad (1)$$

แบบจำลองสมการลดรูปแสดงถึงแบบจำลองที่ลดจำนวนตัวแปรอิสระลงจากแบบจำลองแบบเต็มจำนวนเพื่อให้โมเดลมีความเหมาะสมและตัดตัวแปรที่ไม่ส่งผลกระทบต่อทดลอง หรือมีค่า p -value มากกว่า 0.05

แบบจำลองสมการลดรูป (Reduced-form Equations)

$$\begin{aligned} \text{เปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็ง} = & 23.822 + 3.262B \\ & + 1.038C + 0.980D - 1.079AB + 4.881AD - 6.424BC \\ & + 1.580CD - 3.513ABC - 5.288ABD + 3.352ACD + \\ & 1.981BCD - 3.092ABCD - 17.01 Ct Pt \end{aligned} \quad (2)$$

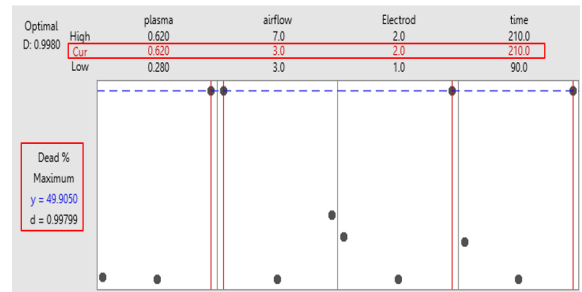
จากการวิเคราะห์หา Response Optimizer แสดงค่าการตายของเซลล์มะเร็งที่สูงที่สุดเท่ากับ 49.91% จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือของโปรแกรมมินิแทป 21 แสดงดังรูปที่ 7 ปัจจัยที่ทำให้เซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายร้ายตายสูงที่สุดประกอบด้วย ระดับความเข้มข้นพลาสมาระดับ 3 (0.62 วัตต์) อัตราการไหลของอากาศ 3 ลิตรต่อนาที ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดกับผิวของมีเดีย 2 เซนติเมตร และเวลาในการดิสชาร์จพลาสมา 210 วินาที

3.2 ยืนยันผลการทดลองตรวจสอบข้อมูลเงื่อนไขการตายสูงที่สุด 5 ข้อ

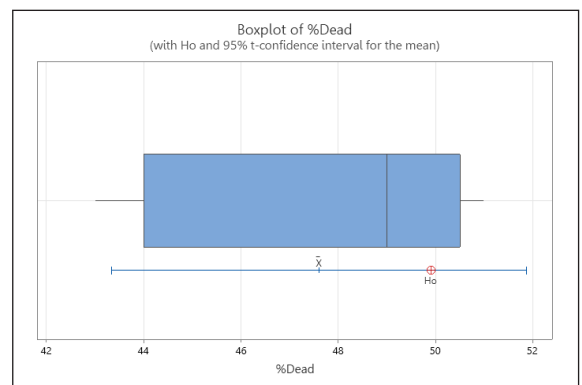
ทำการตรวจสอบข้อมูลเงื่อนไขการตายสูงที่สุด 5 ข้อเพื่อยืนยันผลการทดลองจากเครื่องนับเซลล์

จากข้อมูลการตายของเซลล์มะเร็งหลังจากการรักษาด้วยพลาสมาข้อมูลการทดสอบ T-Test เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างสองกลุ่ม โดยเปรียบเทียบการตายของเซลล์มะเร็งหลังการทดสอบพลาสมาจากการทำนายโดยโปรแกรมมินิแทป (49.91%) และจากการทดลองจริง

ผลการทดสอบ T-Test ดังตารางที่ 4 พบว่า p -value เท่ากับ 0.208 จึงไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักที่ว่า



รูปที่ 7 ค่าเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็งที่สูงที่สุด



รูปที่ 8 Boxplot ที่ได้จากโปรแกรมมินิแทป 21

ค่าเฉลี่ยของการตายของเซลล์มะเร็งหลังการรักษาด้วยพลาสมาไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ทำนายไว้สอดคล้องกับผลของ Box Plot ดังรูปที่ 8 แสดงถึงช่วงเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ค่าเฉลี่ย $47.60 \pm 3.44\%$ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็งที่สูงที่สุดที่ 49.91% อยู่ในช่วงความเชื่อมั่น โดยแสดงผลการทดลอง ดังตารางที่ 4 และรูปที่ 8

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์จากโปรแกรมมินิแทป 21

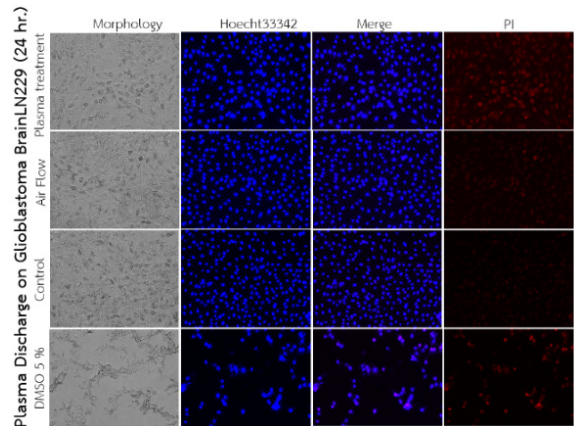
μ : population mean of % Dead	
Null hypothesis	$H_0: \mu = 49.91$
Alternative hypothesis	$H_1: \mu \neq 49.91$
T-Value	p -value
-1.50	0.208
StDev = 3.44	95% CI for μ (43.33, 51.87)

สอดคล้องกับงานวิจัยของงานวิจัยกษกร และคณะ [16] ใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลในการรักษาเซลล์มะเร็งด้วยพลาสมา ส่งผลให้การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งน้อยที่สุดเท่ากับ 32.10% โดยเงื่อนไขการทดลองที่ดีที่สุด คือ เวลา 120 วินาที ปริมาณออกซิเจนกับอาร์กอน 10 มิลลิตรต่อนาที และกำลังพลาสมา 30 วัตต์ ซึ่งจากข้อมูลของ Keidar และคณะ [23] แต่ละงานวิจัยมีระดับปัจจัยในการทดลองไม่เท่ากัน เนื่องจากเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อการรักษาแตกต่างกัน เครื่องพลาสมา มีการผลิตพลาสมาแตกต่างกัน และปัจจัยแวดล้อมส่งผลให้ห้องปฏิบัติการปรับปรุงปัจจัยให้สอดคล้องกับสภาพแวดล้อมจริง

3.3 ผลการทดลองศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรง

ผลการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งสมองในเงื่อนไขการตายสูงที่สุด โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 สภาวะ ประกอบด้วย เซลล์ที่รักษาด้วยพลาสมา เซลล์ที่ทำการควบคุม (Control) เซลล์ที่รักษาด้วยอากาศ (Air Flow) และเซลล์ที่มีการเติมสาร DMSO 5% ซึ่งเป็นปัจจัยควบคุมเชิงบวก (Positive Control) ที่เป็นมีความพิษกับเซลล์ ซึ่งผลการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาของเซลล์มะเร็งสมอง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ แสดงดังรูปที่ 9

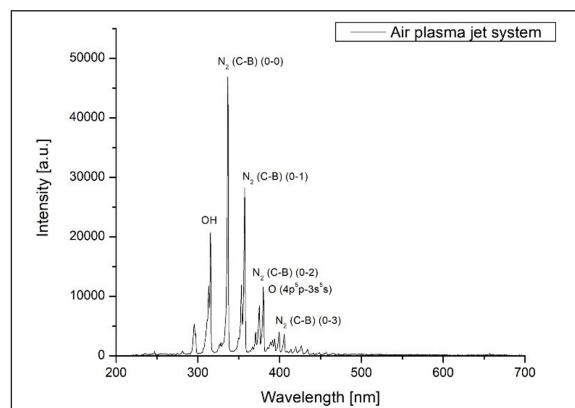
จากภาพสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง สีย้อม PI ของเซลล์ที่รักษาด้วยพลาสมามีความเรืองแสงสีแดงหนาแน่นกว่า เซลล์ที่ทำการควบคุม และเซลล์ที่รักษาด้วยอากาศ เซลล์ที่มีการเติมสาร DMSO 5% คือ ปัจจัยควบคุมเชิงบวก ที่เป็นมีความพิษกับเซลล์ เซลล์เรืองแสงสีแดงลักษณะไม่เป็นรูปทรงและแตกกระจายตัว จากผลการทดลองที่ได้จากภาพสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง หลังจากทดลองรักษาเซลล์มะเร็งด้วยพลาสมา ส่งผลให้การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ทำการควบคุมและเซลล์ที่รักษาด้วยอากาศ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Azzariti และคณะ [24] ได้ทำการรักษาเซลล์มะเร็งต่อมไทรอยด์ด้วยพลาสมาเซลล์มีการตายสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 9 ภาพสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง

3.4 ผลการทดลองตรวจสอบ Optical Emission Spectrometer

ผลการทดสอบส่วนประกอบทางเคมี (OES) ของพลาสมาในเงื่อนไขที่ดีที่สุดของการทดลอง แสดงดังรูปที่ 10 จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่น (Wavelength) และความเข้มแสง (Intensity) พบว่า ความเข้มแสงและความยาวคลื่น N_2 336.61 นาโนเมตร สูงที่สุด ตามมาด้วยความยาวคลื่น OH 308.98 นาโนเมตร และความยาวคลื่น O_3 500 นาโนเมตร ต่ำที่สุดแต่ยังมีส่วนสำคัญในการแสดงถึงองค์ประกอบทางเคมีในพลาสมา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mrotzek และคณะ [25] เนื่องจากการตรวจสอบความยาวคลื่นนี้สามารถแสดงข้อมูลเกี่ยวกับสถานะและ

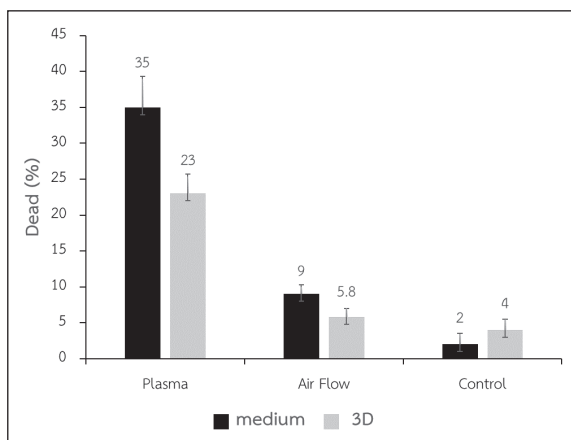


รูปที่ 10 ผลการตรวจสอบ OES

ปฏิกิริยาของสารประกอบในพลาสมา การศึกษาความเข้มแสงของพลาสมาที่ความยาวคลื่นเฉพาะเหล่านี้เป็นเครื่องมือสำคัญในการวิเคราะห์และองค์ประกอบทางเคมีของพลาสมา

3.5 ผลการทดลองสร้างโครงร่าง 3 มิติ เพื่อทำการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในอาหารเลี้ยงเซลล์

ผลจากการทดลองเปรียบเทียบกับผลการทดลองในโครงร่าง 3 มิติ และในอาหารเลี้ยงเซลล์ในเงื่อนไขการตายสูงสุด แสดงผลการทดลอง ดังรูปที่ 11 จากการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งในโครงร่าง 3 มิติ เซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรงมีการตายสูงสุดที่ 23% และการทดลองเพาะในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์มีการตายสูงสุดที่ 35.00% จากผลการทดลองรักษาด้วยพลาสมาส่งผลให้เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญมากที่สุด แต่เซลล์ที่รักษาด้วยอากาศ และเซลล์ที่ทำการควบคุม ส่งผลให้เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญต่อเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรงเพียงเล็กน้อยสอดคล้องกับงานวิจัยกษกร และคณะ [16] เลี้ยงเซลล์มะเร็งในโครงร่างสามมิติรักษาโดยพลาสมาทำให้การมีชีวิตของเซลล์มะเร็งน้อยที่สุด 83.33% โดยเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ถูกกำจัดมากกว่า จากข้อมูลของ Sato และคณะ [26] ในโครงร่างสามมิติช่วยปกป้องเซลล์จากพลาสมา แต่ในการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์สัมผัสกับมีเดียทำให้พลาสมาออกฤทธิ์โดยตรง



รูปที่ 11 ผลการทดลองในโครงร่าง 3 มิติ และอาหารเลี้ยง

4. สรุป

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการใช้พลาสมาเย็นในบรรยากาศรู้นดิงเกล จากผลการทดลองของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า พลาสมาสามารถกำจัดเซลล์มะเร็งสมองในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยทำการทดลองตามเงื่อนไขที่ได้ทำการออกแบบ ซึ่งเป็นการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มจำนวน โดยใช้โปรแกรมมินิแทป 21 วิเคราะห์ผลการทดลองจากเครื่องนับเซลล์แสดงข้อมูลการตายของเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรงสูงสุดเท่ากับ 49.91% โดยเงื่อนไขการทดลองที่ดีที่สุด คือ ความเข้มพลาสมาระดับ 3 (0.62 วัตต์) อัตราการไหลของอากาศ 3 ลิตรต่อนาที ระยะห่างระหว่างอิเล็กโทรดกับผิวของมีเดีย 2 เซนติเมตร และเวลาในการดิสชาร์จพลาสมา 210 วินาที และจากการยืนยันผลการทดลอง โดยทำการทดลองในเงื่อนไขที่ดีที่สุดจำนวน 5 ซ้ำ พบว่า p -value เท่ากับ 0.208 จึงไม่สามารถปฏิเสธสมมติฐานหลักได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ทำนายไว้สอดคล้องกับผล Box Plot แสดงถึงช่วงเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่ค่าเฉลี่ย $47.60 \pm 3.44\%$ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์มะเร็งที่สูงที่สุดที่ 49.91% อยู่ในช่วงความเชื่อมั่น

จากผลการศึกษาสถิติฐานวิทยาของเซลล์ที่ 24 ชั่วโมง เซลล์ที่รักษาด้วยพลาสมา มีการเรืองแสงสีแดงลักษณะเป็นทรงกลมไม่แตกกระจายตัว เซลล์มีการเรืองแสงสีแดงหนาแน่นกว่าเซลล์ที่ทำการควบคุม และเซลล์ที่รักษาด้วยอากาศ แต่เซลล์ที่มีการเติมสาร DMSO 5% เซลล์เรืองแสงสีแดงลักษณะแตกกระจายตัวเนื่องจากโดนสารพิษ

และจากการรักษาเซลล์มะเร็งสมองในโครงร่างสามมิติสามารถกำจัดเซลล์มะเร็งสูงสุด 29.40% ในเงื่อนไขการทดลองที่ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง แต่เซลล์ที่รักษาด้วยอากาศ และเซลล์ที่ทำการควบคุมส่งผลให้เกิดการตายอย่างมีนัยสำคัญต่อเซลล์มะเร็งสมองชนิดร้ายแรงเพียงเล็กน้อย

ซึ่งงานวิจัยนี้มีความประสงค์ที่จะเป็นงานวิจัยอีกชิ้นงานวิจัยที่จะช่วยสร้างความเข้าใจในการนำพลาสมาไปใช้ในการกำจัดกลัยโอบลาสโตมาในหลอดทดลอง และใช้เป็นแนวทางในการรักษาโรคมะเร็งสมองชนิดร้ายแรงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์กระตุ้นพลาสมา

ข้อเสนอแนะงานวิจัยในอนาคต คือ ในการทดลองควรมีการวางแผน และจัดลำดับการทดลองให้แม่นยำมากที่สุด เพื่อลดข้อบกพร่องที่จะเกิดขึ้นในการทดลอง เนื่องจากในการทดลองอาจมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลาที่ใช้ในการทดลองและควรทำการตรวจสอบปัจจัยที่อาจมีผลต่อการทดลองอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น อุณหภูมิหรือสภาวะแวดล้อมของการทดลอง เพื่อลดการแปรปรวนของข้อมูล และเพื่อให้ผลการทดลองมีความแม่นยำที่สุด และควรทำการทดลองเชิงชีววิทยา (Biological Experimentation) ที่มีการศึกษาเชิงลึกมากขึ้น เช่น ทดสอบว่าพลาสมา มีอิทธิพลต่อกระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ (Signaling Pathway) อย่างไร

เอกสารอ้างอิง

- [1] N. Takerngdej. (2021). *GBM: Jod Mai Rak the Letter*. Ramkhamhaeng Hospital. [Online] (in Thai). Available: https://www.ramhosp.co.th/news_detail/769
- [2] J. Chindaprasirt, K. Wirasorn, and A. Sookprasert. (2015). *High-grade glioma brain tumor: Treatments and molecular markers*. [Online] (in Thai). Available: http://www.smj.ejnal.com/e-journal/showdetail/?show_detail=T&art_id=1943
- [3] National Cancer Institute of Thailand. (2018). *Hospital-based cancer registry 2018*. [Online] (in Thai). Available: https://www.nci.go.th/th/cancer_record/cancer_rec1.html
- [4] National Cancer Institute of Thailand. (2019). *Hospital-based cancer registry 2019*. [Online] (in Thai). Available: https://www.nci.go.th/th/cancer_record/cancer_rec1.html
- [5] National Cancer Institute of Thailand. (2020). *Hospital-based cancer registry 2020*. [Online] (in Thai) Available: https://www.nci.go.th/e_book/hosbased_2563/index.html
- [6] National Cancer Institute of Thailand. (2021). *Hospital-based cancer registry 2021*. [Online] (in Thai) Available: https://www.nci.go.th/e_book/hosbased_2564/index.html
- [7] National Cancer Institute of Thailand.(2022). *Hospital-based cancer registry 2022*. [Online] (in Thai)Available: https://www.nci.go.th/th/cancer_record/cancer_rec1.html
- [8] N. Hirankarn.(2019). *Cellular immunotherapy research for cancer*. [Online] (in Thai) Available:<https://kcmh.chulalongkornhospital.go.th>
- [9] A. Kazemi, M. J. Nicol, S. G. Bilén, G. S. Kirimanjeswara, and S. D. Knecht, “Cold atmospheric plasma medicine: Applications, challenges, and opportunities for predictive control,” *Plasma*, vol. 7, no. 1, pp. 233–257, 2024.
- [10] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, F. Kikkawa, and M. Hori, “Plasma-activated medium selectively kills glioblastoma brain tumor cells by downregulating a survival signaling molecule, AKT Kinase,” *Plasma Medicine*, vol. 1, pp. 265–277, 2011.
- [11] G. Bauer, D. Sersenová, G. David, and Z. Machala, “Cold atmospheric plasma and plasma-activated medium trigger RONS-based tumor cell apoptosis,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 14210, Sep. 2019.
- [12] U. S. Srinivas, B. W. Tan, B. A. Vellayappan, and A. D. Jeyasekharan, “ROS and the DNA damage response in cancer,” *Redox Biology*, vol. 25, pp. 101084, Jan. 2019.
- [13] D. Yan, A. Talbot, N. Nourmohammadi, J. Sherman,

- X. Cheng, and M. Keidar, "Toward understanding the selective anticancer capacity of cold atmospheric plasma - A model based on aquaporins," *Review*, vol. 10, no. 4, Dec. 2015.
- [14] A. Sakunphueak, "Free radicals and anti-oxidants," *CCPE*, 2016.
- [15] A. Phaniendra, D. Jestadi, and L. Periyasamy, "Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases," *PMC*, vol. 30, pp. 11-26, 2015.
- [16] K. Moonsup, S. Udomsom, and W. Wattanuchariya, "Impact of plasma treatment on cancer cell culture in 3D biomaterial scaffold," *Naresuan University Engineering Journal*, vol. 12, no. 2, pp. 111-120, Jul.-Dec. 2017 (in Thai).
- [17] J. Körtzer, V. Boxhammer, A. Schäfer, T. Shimizu, T. G. Klämpfl, Y. F. Li, C. Welz, S. S. Zieger, G. E. Morfill, Julia L Zimmermann, and Jürgen Schlegel, "Restoration of sensitivity in chemo-resistant glioma cells by cold atmospheric plasma," *PLoS One*, vol. 8, no. 5, pp. e64498, May 2013.
- [18] J. Privat-Maldonado, A. L. O'Connell, S. Welch, S. V. Milosavljević, A. S. Stack, J. G. V. Mirabal, S. Flynn, M. Mennillo, M. Keidar, J. C. Gill, J. M. Lyng, and P. Bourke, "Auranofin and cold atmospheric plasma synergize to trigger distinct cell death mechanisms and immunogenic responses in glioblastoma," *Cells*, vol. 10, no. 11, pp. 2936, Nov. 2021.
- [19] D. C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, 10th ed. Hoboken, NJ, USA: Wiley, 2019.
- [20] N. Vichiansan, K. Chatmaniwat, M. Sungkorn, K. Leksakul, P. Chaopaisarn, and D. Boonyawan, "Effect of plasma-activated water generated using plasma jet on tomato (*Solanum lycopersicum* L. var. cerasiforme) seedling growth," *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 42, no. 2, pp. 935-945, 2022.
- [21] N. Chairuang, "The effect of inconsistency between assessment standards and teachers' evaluation on mathematics learning achievement of mathayomsuksa 4 students in Chiang Mai province," M.S. thesis, Sukhothai Thammathirat Open University, 2020 (in Thai).
- [22] D. C. Montgomery and G. C. Runger, *Applied Statistics and Probability for Engineers*, 6th ed., Wiley, 2014.
- [23] M. Keidar, D. Yan, I. Beilis, B. Trink, and J. H. Sherman, "Plasmas for cancer treatment," *Physics of Plasmas*, vol. 25, no. 8, 083504, 2018.
- [24] A. Azzariti, R. M. Iacobazzi, R. Di Fonte, L. Porcelli, R. Gristina, P. Favia, F. Fracassi, I. Trizio, N. Silvestris, G. Guida, S. Tommasi, and E. Sardella, "Plasma-activated medium triggers cell death and the presentation of immune activating danger signals in melanoma and pancreatic cancer cells," *Scientific Reports*, vol. 9, no. 40637, 2019.
- [25] J. Mrotzek and W. Viöl, "Spectroscopic characterization of an atmospheric pressure plasma jet used for cold plasma spraying," *Applied Sciences*, vol. 12, no. 13, pp. 6814, 2022.
- [26] R. Sato, Y. Morimoto, M. Hirayama, T. Matsuura, and S. Takeuchi, "3D culture of tumor cells using microfabricated devices for cellular analysis and drug screening," *Analytical Sciences*, vol. 36, no. 2, pp. 203-210, 2020.

