

บทที่ 3

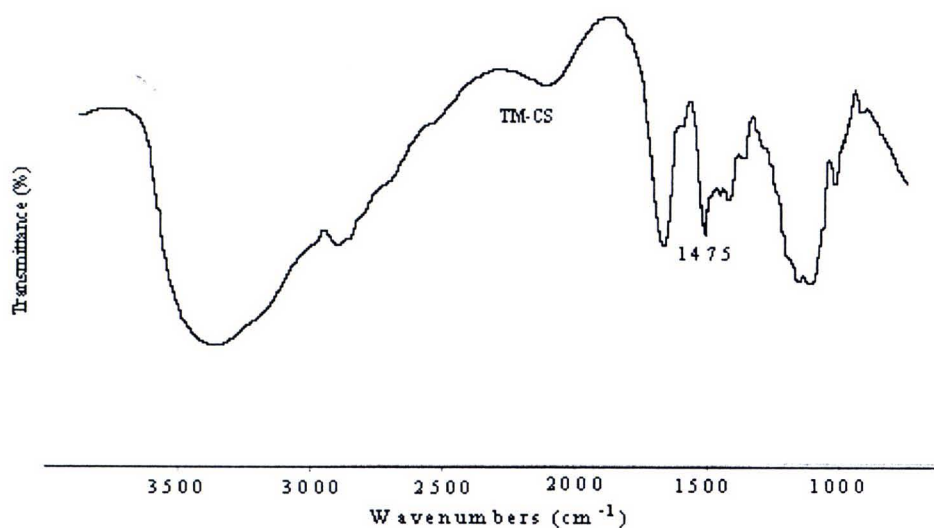
ผลการวิจัย



1. การสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน

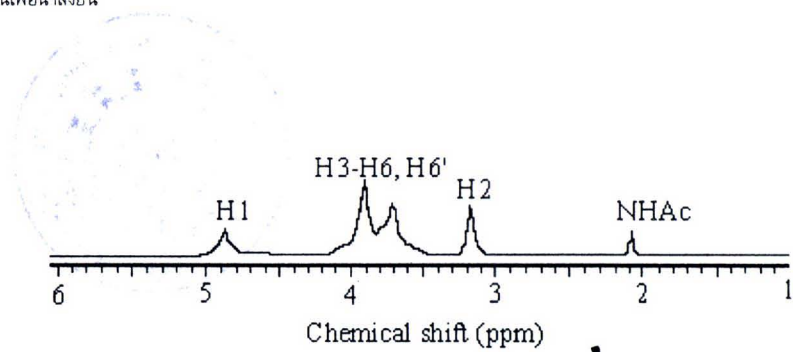
1.1 Methylated chitosan (TM₄₃-CS)

รูปที่ 5 แสดง FT-IR (KBr) spectra ของ TM₄₃-CS ส่วนรูปที่ 6 และ 7 แสดง ¹H-NMR spectra ของ ไคโตซานและ TM₄₃-CS ตามลำดับ NMR spectrum ของ TM₄₃-CS จะมีลักษณะคล้ายกับ ไคโตซาน แต่จะปรากฏสัญญาณที่ตำแหน่ง 3.2 ppm ซึ่งแสดง ว่ามีหมู่ methylation ในโครงสร้าง โมเลกุลของ TM₄₃-CS

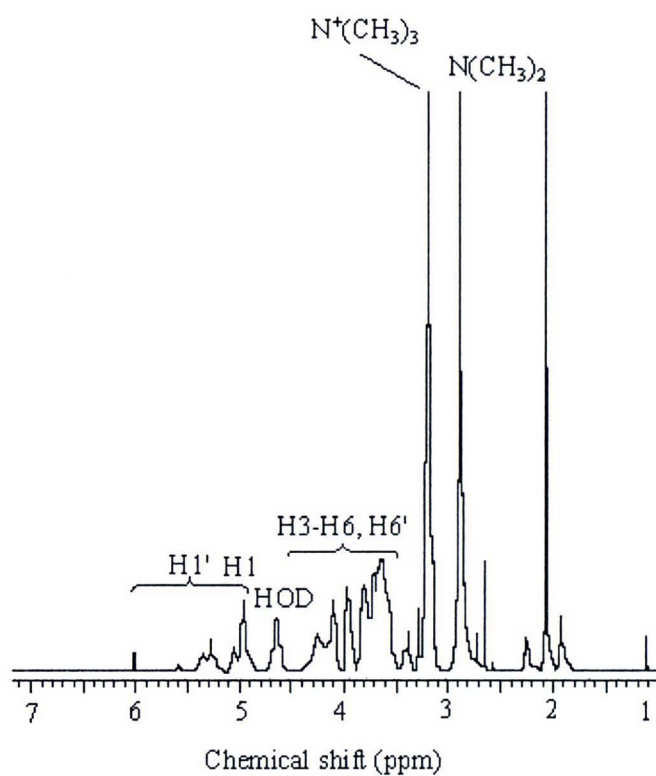


รูปที่ 5 FT-IR (KBr) spectra of TM₄₃-CS

การพัฒนาอนุพันธ์โคโคซานเพื่อนำส่งยีน



รูปที่ 6 ^1H -NMR spectra ของ CS ($\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOD}$)



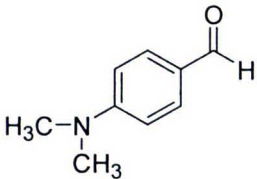
รูปที่ 7 ^1H -NMR spectra ของ $\text{TM}_{43}\text{-CS}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOD}$)

1.2 methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan (TM-Bz-CS)

1.2.1 การสังเคราะห์ N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan (DM-Bz-CS)

จากสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน คือ N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan โดยทำการ N-benylation ได้ %Substitution ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 The N-benylation of chitosan

Samples	Aldehydes	%Substitution targeted	FW ^a	%ES ^b	%Yield ^c
A		300	219.6	42.2	61.2
		100	186.8	17.5	59.5
		50	176.8	10.0	70.0

^aFormula weight (FW) = 12.2+(FWof N-benzyl GluN×ES)+163.5×(0.94-ES)

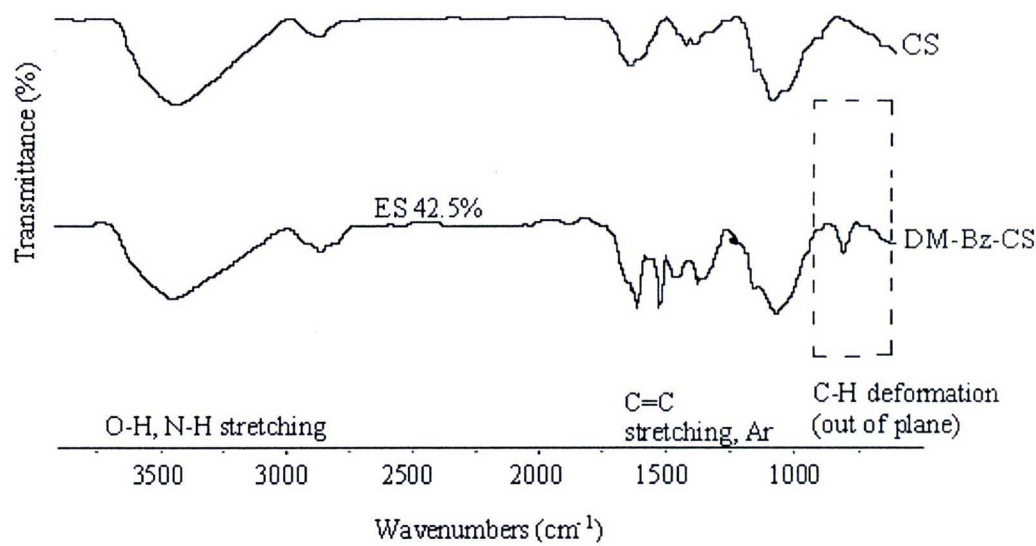
^bDetermined by ¹H-NMR; ES (%) = (Ar/n/H2+H2'+1/3NAc)×100

^cYield (%) = (FW of N-benzyl GluN of product/FWof GluN of chitosan) ×100

ES = The extent of N-substitution

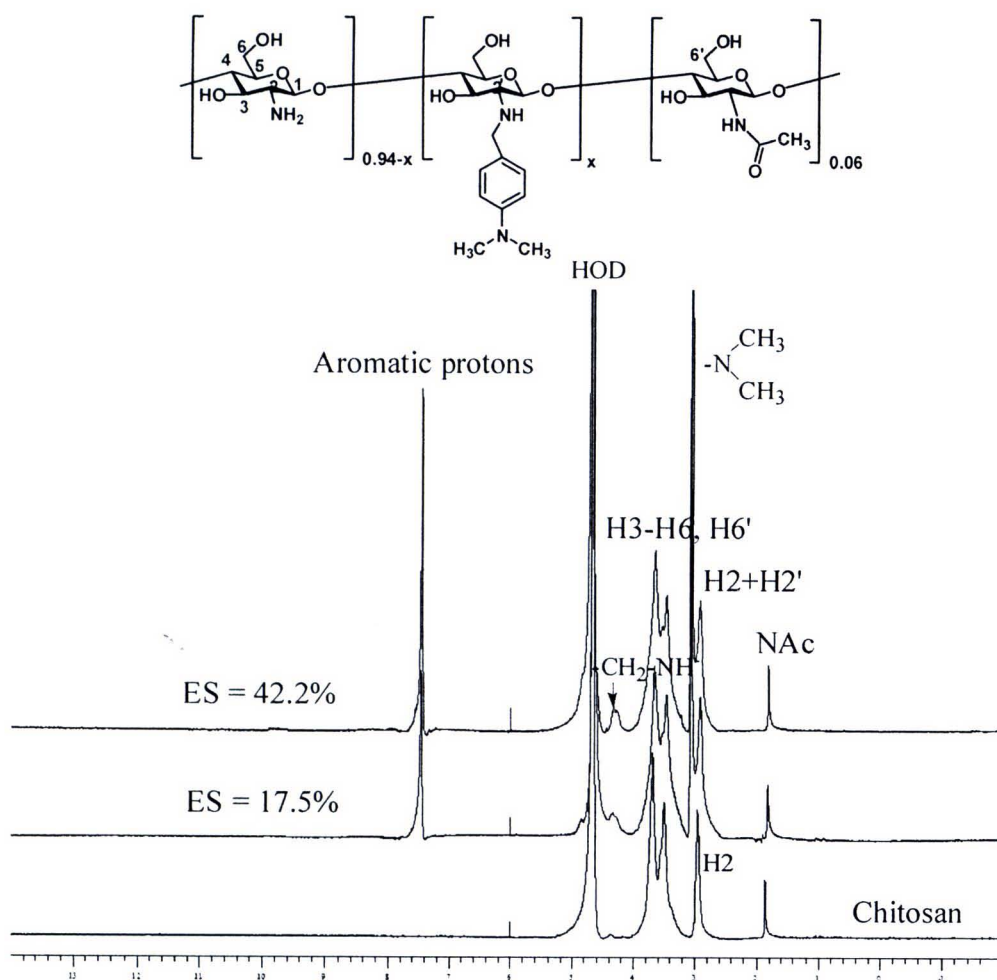
ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพฟิสิกส์ของอนุพันธ์ไคโตซานที่เตรียมได้ โดยใช้ IR spectra (a Nicolet Impact 410 Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrometer) เตรียมตัวอย่างโดยใช้ potassium bromide และ เครื่อง ¹H-NMR (a Mercury Varian 400 MHz spectrometer) โดยละลาย 10 mg chitosan and N-benzyl chitosans ด้วย 1% (v/v) D₂O/CF₃COOD.

FT-IR spectra ของ CS และ DM-Bz-CS ที่มี degrees of substitution เท่ากับ 42.5% แสดงในรูปที่ 8 absorption bands ที่ wavenumber 3430 cm⁻¹ คือ OH และ NH₂ groups absorption bands ที่ wavenumber 1648 และ 1377 cm⁻¹ คือ C=O และ C-O stretching ของ amide group ส่วน absorption bands ที่ wavenumber 1594 cm⁻¹ คือ N-H deformation ของ amino groups ส่วน 1155, 1081 และ 1033 cm⁻¹ คือ symmetric stretching ของ C-O-C และ involved skeletal vibration ของ C-O stretching และ absorption bands อื่นๆ ที่ 1602, 1514 และ 1470 และ 704-836 cm⁻¹ คือ C=C stretching และ C-H bending out of plane ของ aromatic group ตามลำดับ



รูปที่ 8 FT-IR (KBr) spectra of CS and DM-Bz-CS

รูปที่ 9 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ CS และ DM-Bz-CS ที่มี % ES เท่ากับ 42.5% และ 17.5 % ES

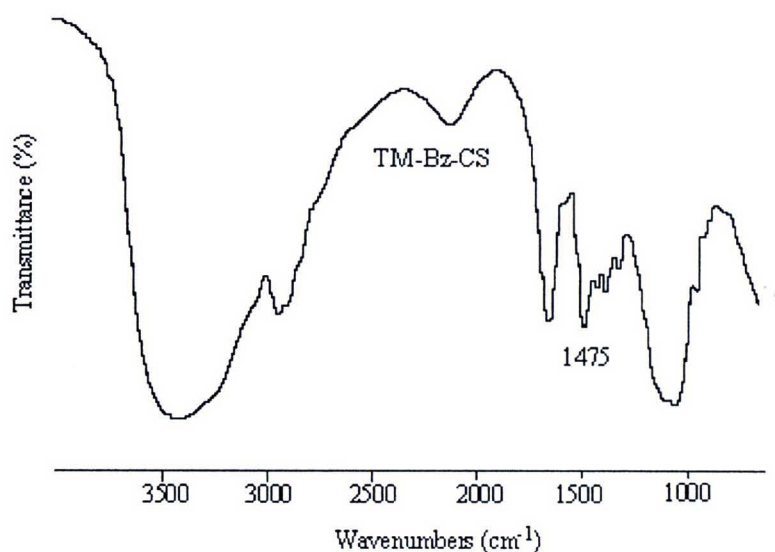


รูปที่ 9 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ CS และ DM-Bz-CS ($\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOD}$)

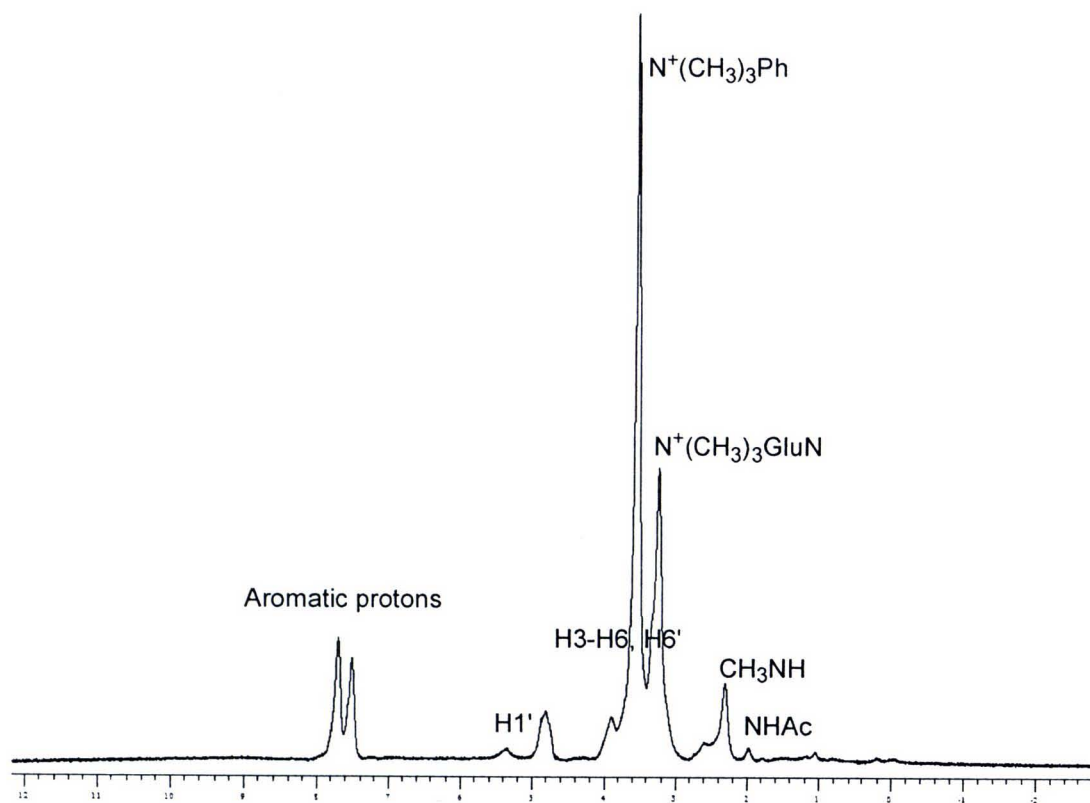
N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan, A. FT-IR(KBr): 3430 cm^{-1} (O-H and N-H stretching), 2923 cm^{-1} (C-H stretching CH_2), 1602, 1526 cm^{-1} (C=C stretching of aromatic group), 1377 cm^{-1} (C-O stretching of amide group), 1155 cm^{-1} (C-O-C asymmetric stretching of GluN), 1081, 1033 cm^{-1} (C-O stretching of GluN), 811 cm^{-1} (C-H bending out of plan of aromatic group). $^1\text{H-NMR}$ ($\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOD}$): δ (ppm) = 7.52 (s; 4H Ph), 4.93 (s; 1H H1), 4.42-3.53 (br. m; 7H -NH- CH_2 -, H3, H4, H5, H6 and H6'), 3.12 (s; 6H $\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{Ph}$), 2.97 (br. s; 1H H2 and H2'), 1.91 (s; 3H NHCOCH_3).

1.2.2 การสังเคราะห์ methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan (TM-Bz-CS)

การสังเคราะห์ TM-Bz-CS แสดงในรูปที่ 3 % quaternization ดังแสดงในตารางที่ 2 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพฟิสิกส์ของอนุพันธ์ไคโตซานที่เตรียมได้ โดยใช้ IR spectra (a Nicolet Impact 410 Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectrometer) เตรียมตัวอย่างโดยใช้ potassium bromide และ เครื่อง $^1\text{H-NMR}$ (a Mercury Varian 400 MHz spectrometer) โดยละลาย TM-Bz-CS ด้วย 1% (v/v) $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOD}$ รูปที่ 10 แสดง FT-IR (KBr) spectra ของ TM-Bz-CS ส่วนรูปที่ 11 แสดง $^1\text{H-NMR}$ spectra ของ TM-Bz-CS ตามลำดับ



รูปที่ 10 FT-IR (KBr) spectra ของ TM-Bz-CS



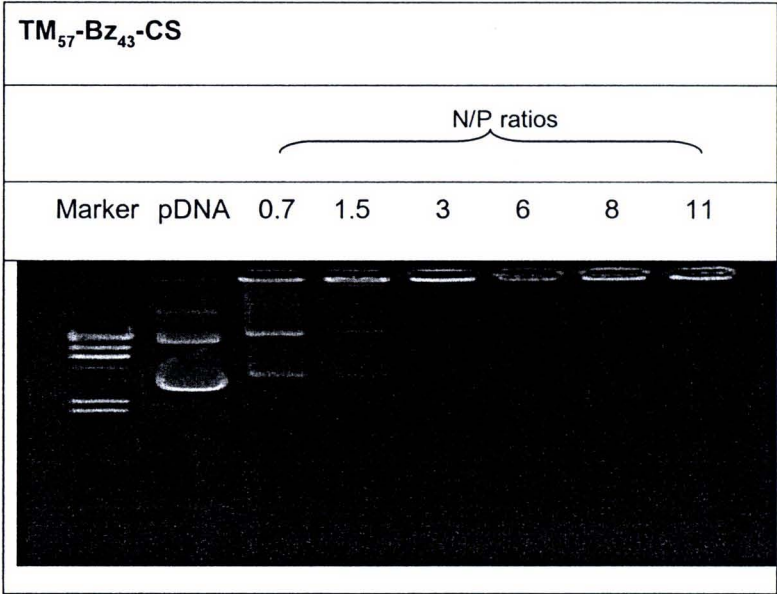
รูปที่ 11 ^1H -NMR spectra ของ methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan (ES=42.5%) in D_2O

^1H -NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOD}$): δ (ppm) = 7.75-7.50 (dd; 4H Ph), 5.34 (s; ^1H H1, H1'), 4.42-3.13 (br. m; 32H -NH-CH₂-, H2, H3, H4, H5, H6 and H6', br. s; $\text{PhN}^+(\text{CH}_3)_3$, s; O-CH₃, br. s; $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$, 2.71 (br. m; 6H $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.31 (s; 3H NHCH_3), 1.97 (s; 3H NHCOCH_3).

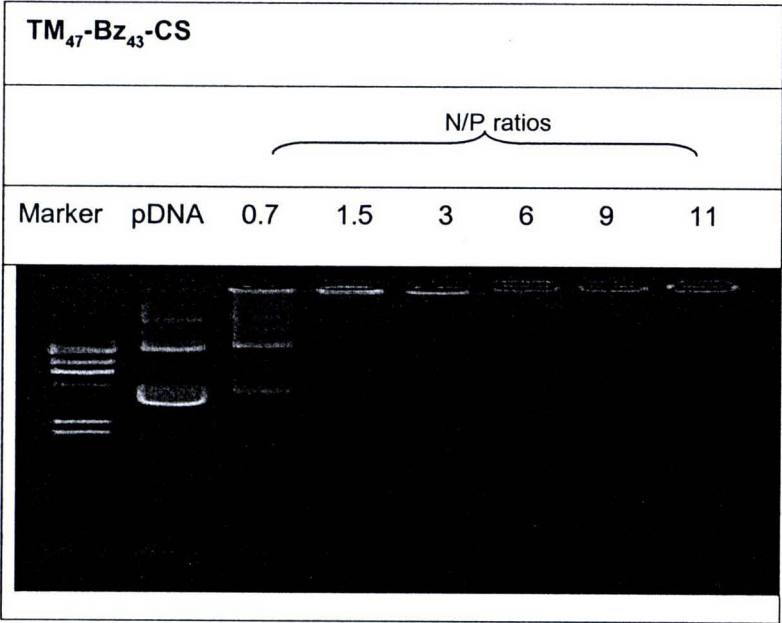
2. ประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของ Plasmid DNA/อนุพันธ์โคโคซานคอมเพล็กซ์ ที่อัตราส่วนต่างๆ

2.1 หาอัตราส่วนที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสมบูรณ์โดยวิธี gel retardation assay

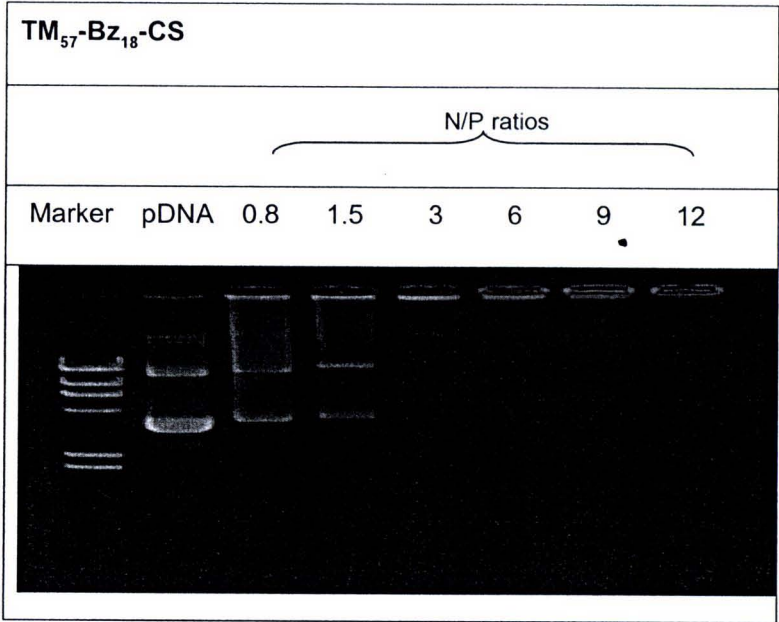
โดยทำการประเมินความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนบน 1 % agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100V เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นย้อมสีด้วย ethidium bromide ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 12-15 และสรุปผลดังตารางที่ 6



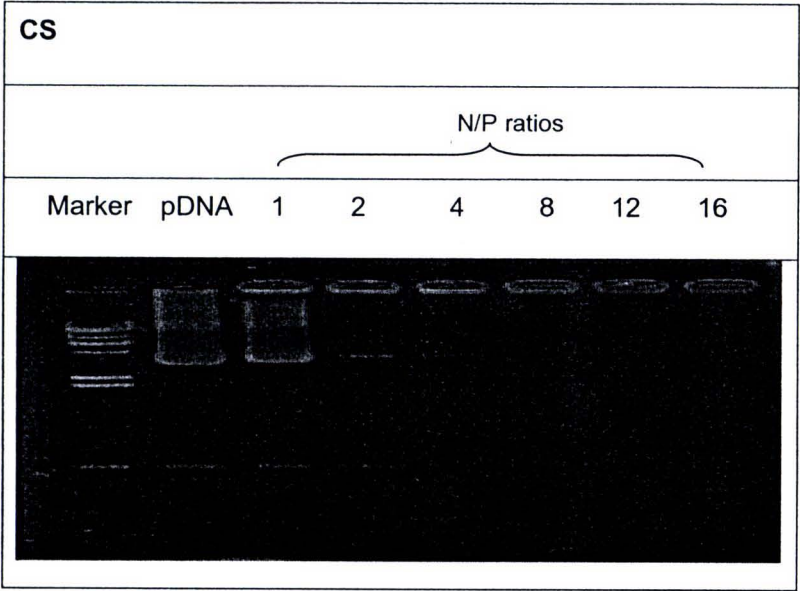
รูปที่ 12 แสดง agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA และ TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes ที่ N/P ratios ต่าง ๆ โดย Lane 1: DNA marker, lane 2: plasmid DNA (0.5 µg) and lane 3-8: TM₅₇-Bz₄₃-CS/DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 0.7, 1.5, 3, 6, 8 และ 11 ตามลำดับ



รูปที่ 13 แสดง agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA และ TM₄₇-Bz₄₃-CS complexes ที่ N/P ratios ต่าง ๆ โดย Lane 1: DNA marker, lane 2: plasmid DNA (0.5 μg) and lane 3-8: TM₄₇-Bz₄₃-CS/DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 0.7, 1.5, 3, 6, 9 และ 11 ตามลำดับ



รูปที่ 14 แสดง agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA และ TM₅₇-Bz₁₈-CS complexes ที่ N/P ratios ต่าง ๆ โดย Lane 1: DNA marker, lane 2: plasmid DNA (0.5 µg) and lane 3-8: TM₅₇-Bz₁₈-CS/DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 0.8, 1.5, 3, 6, 9 และ 12 ตามลำดับ



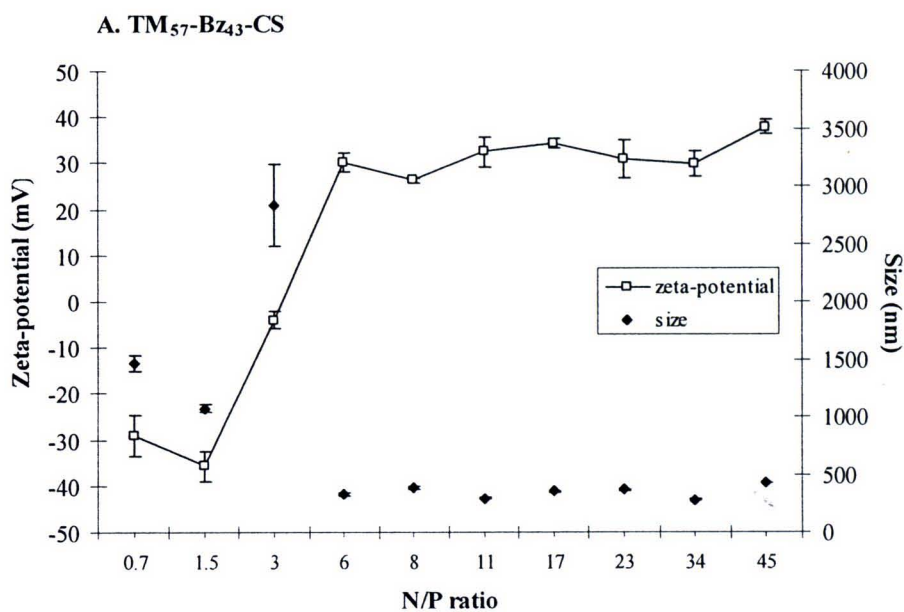
รูปที่ 15 แสดง agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA และ CS complexes ที่ N/P ratios ต่าง ๆ โดย Lane 1: DNA marker, lane 2: plasmid DNA (0.5 μ g) and lane 3-8: CS /DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 1, 2, 4, 8, 12 และ 16 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 สรุป N/P ratio ที่เกิดคอมเพล็กซ์สมบูรณ์ ของโคโตซานเบสและอนุพันธ์โคโตซาน

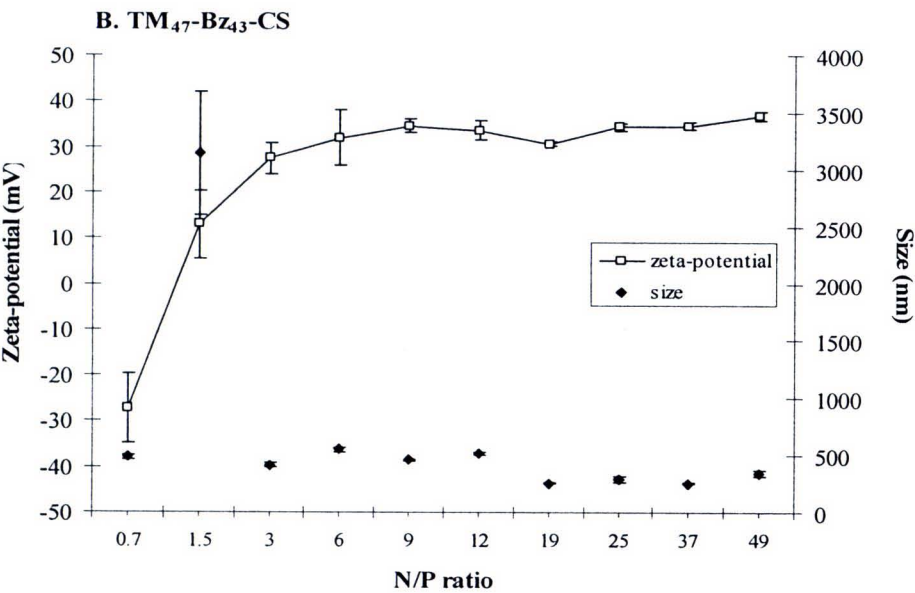
Samples	N/P ratio, which complete complexes formation
TM ₅₇ -Bz ₄₃ -CS	3
TM ₄₇ -Bz ₄₃ -CS	1.5
TM ₅₇ -Bz ₁₈ -CS	3
CS	4

2.2 การวัดขนาดอนุภาคของ pDNA/chitosan complex

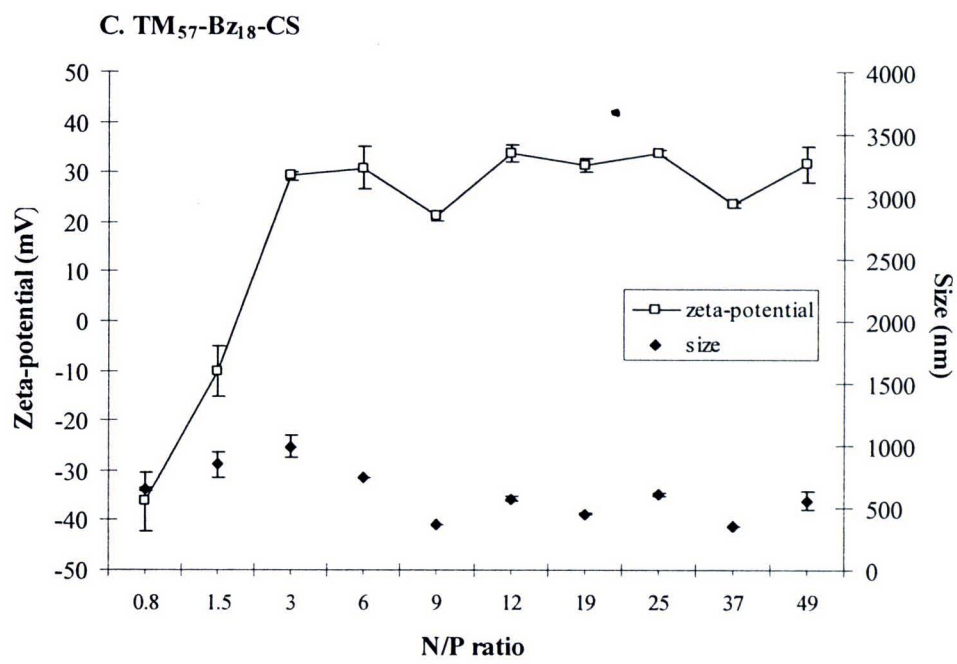
เตรียม pDNA/chitosan complex ที่อัตราส่วนต่างๆ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15-30 นาที เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่สมบูรณ์ หลังจากนั้นเติม sterile water จำนวน 400 μL นำสารละลายที่ได้ไปวัดขนาดอนุภาคและประจุบนพื้นผิวด้วยเครื่อง Zetasizer โดยใช้ automatic mode ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}\text{C}$ ผลของขนาดอนุภาคและประจุบนพื้นผิวแสดงรูปที่ 16-19



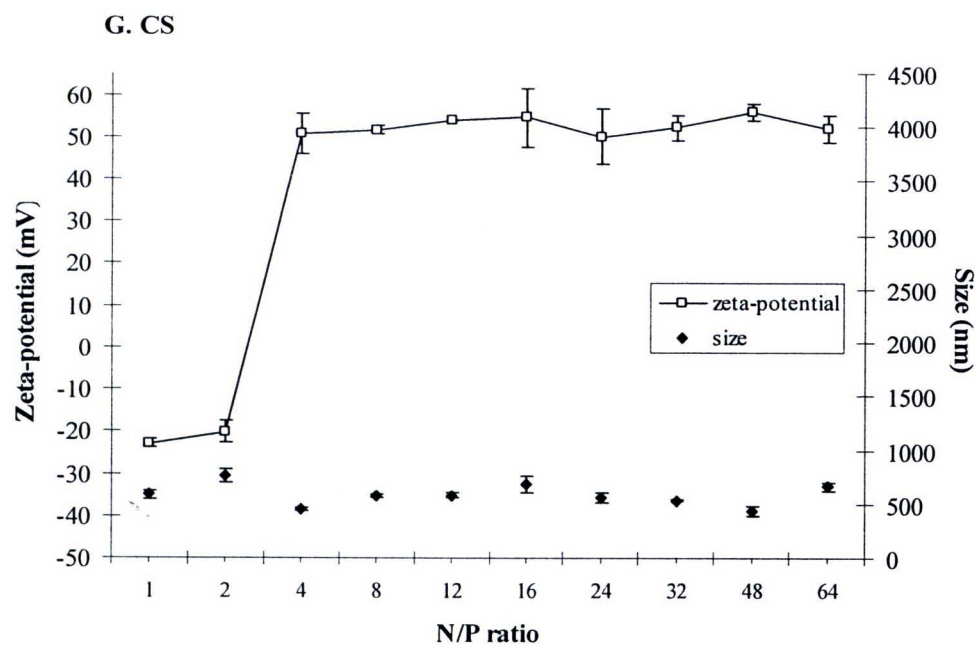
รูปที่ 16 The particle size and zeta-potential of DNA / TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes at various N/P ratio



รูปที่ 17 The particle size and zeta-potential of DNA/TM₄₇-Bz₄₃-CS complexes at various N/P ratio



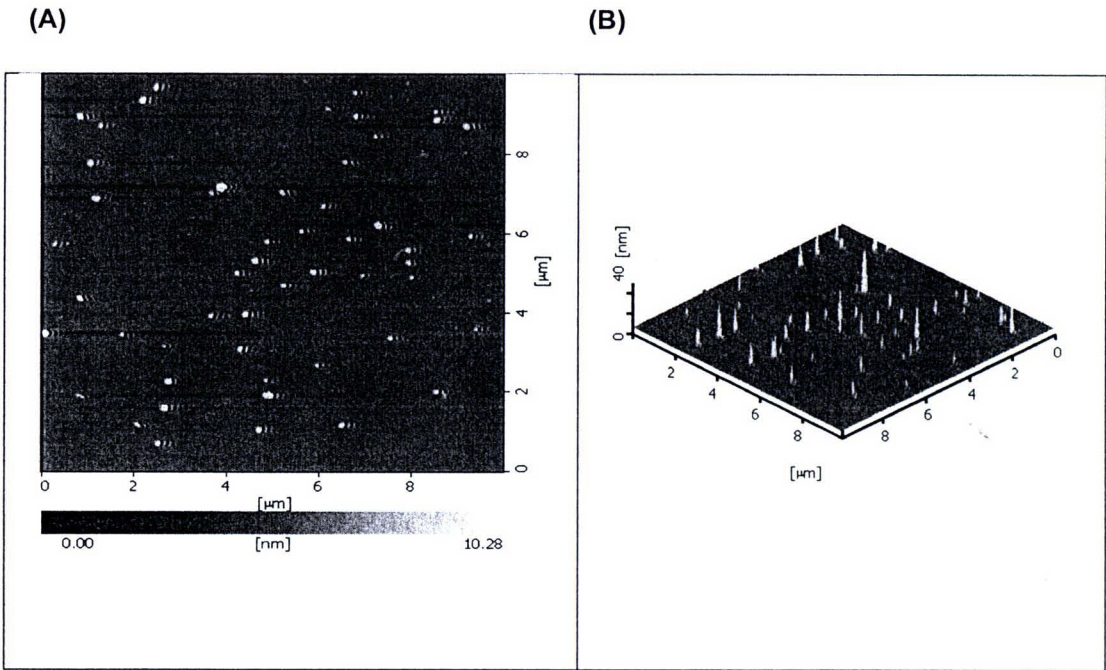
รูปที่ 18 The particle size and zeta-potential of DNA / TM₅₇-Bz₁₈-CS complexes at various N/P ratio



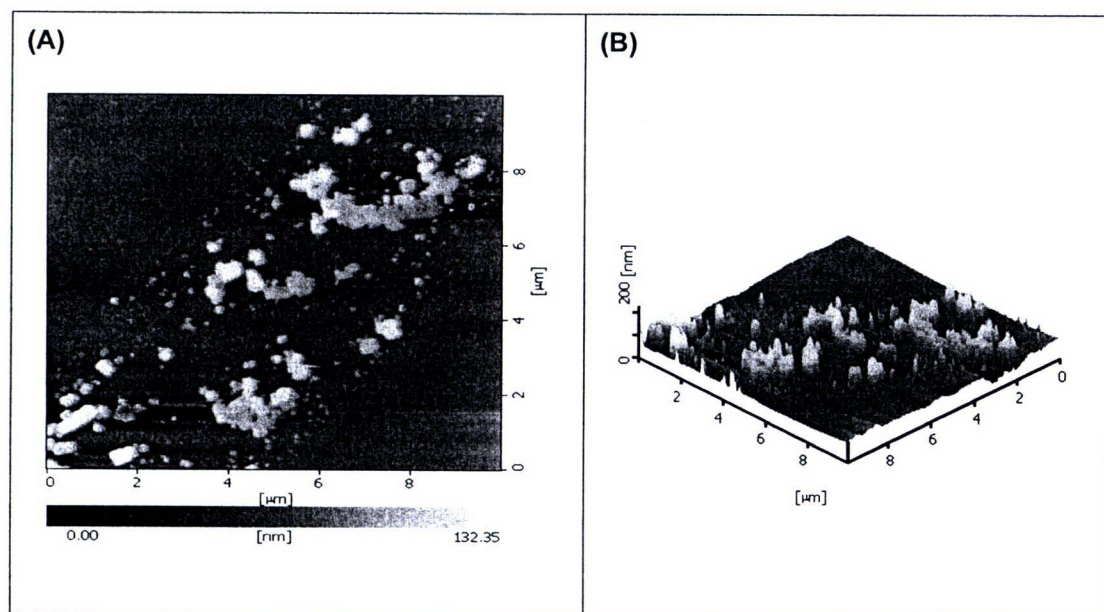
รูปที่ 19 The particle size and zeta-potential of DNA/CS complexes at various N/P ratios

2.3 ตรวจสอบรูปร่างของคอมเพล็กซ์ด้วย Atomic Force Microscope (AFM)

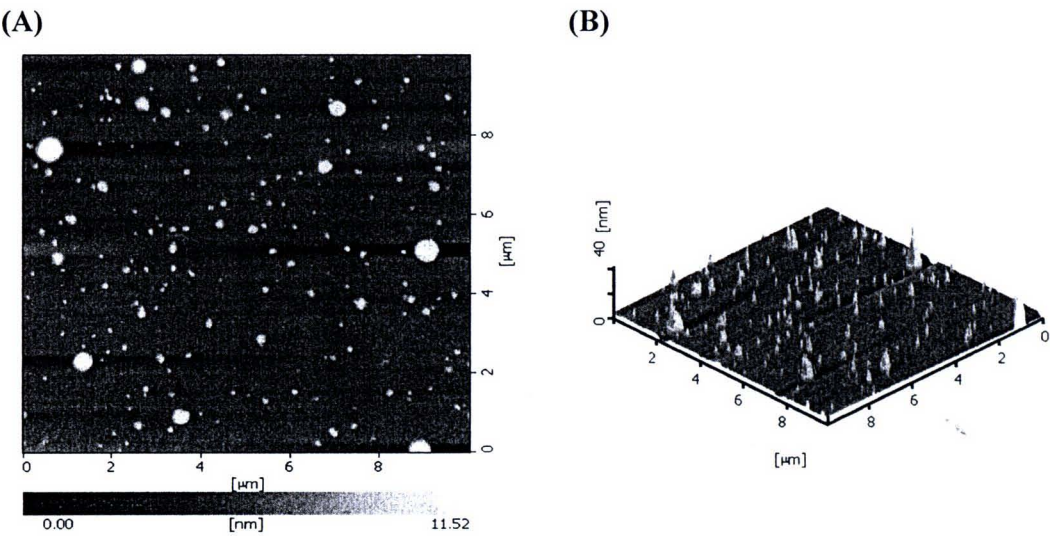
ดูรูปร่างและลักษณะของคอมเพล็กซ์ อนุพันธ์โคโตซาน/DNA โดยใช้เครื่อง AFM โดยนำตัวอย่างคอมเพล็กซ์ที่เตรียมได้มาเจือจางด้วย water ที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน จากนั้นหยดสารตัวอย่างลงบน mica ทำให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำเข้าเครื่อง AFM รูปร่างและลักษณะของคอมเพล็กซ์ อนุพันธ์โคโตซาน/DNA ได้ผลดังแสดงรูปที่ 20-21 ส่วนรูปร่างและลักษณะของคอมเพล็กซ์ PEI/DNA ได้ผลดังแสดงรูปที่ 22



รูปที่ 20 The planar and three-dimensional AFM images of pDNA/TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes (N/P 23); (A) planar images; (B) three-dimensional image.



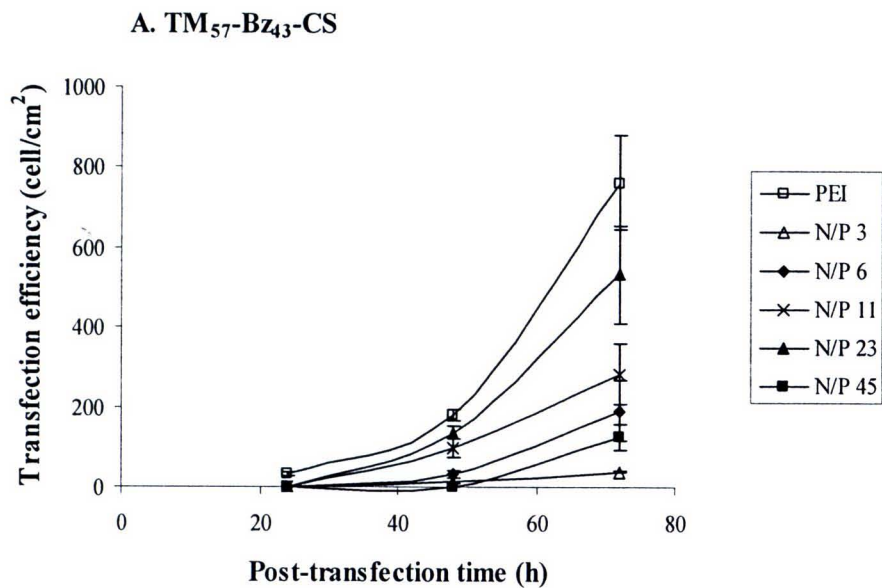
รูปที่ 21 The planar and three-dimensional AFM images of pDNA/TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes (N/P 3); (A) planar images; (B) three-dimensional image.



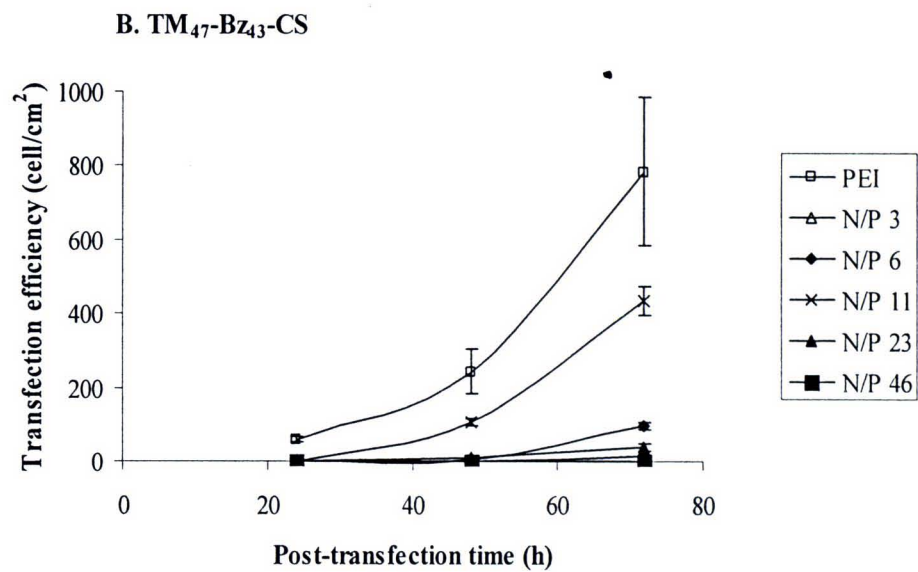
รูปที่ 22 The planar and three-dimensional AFM images of pDNA/PEI complexes (1/1 weight ratio); (A) planar images; (B) three-dimensional image.

3.ทดสอบประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนในเซลล์เพาะเลี้ยง

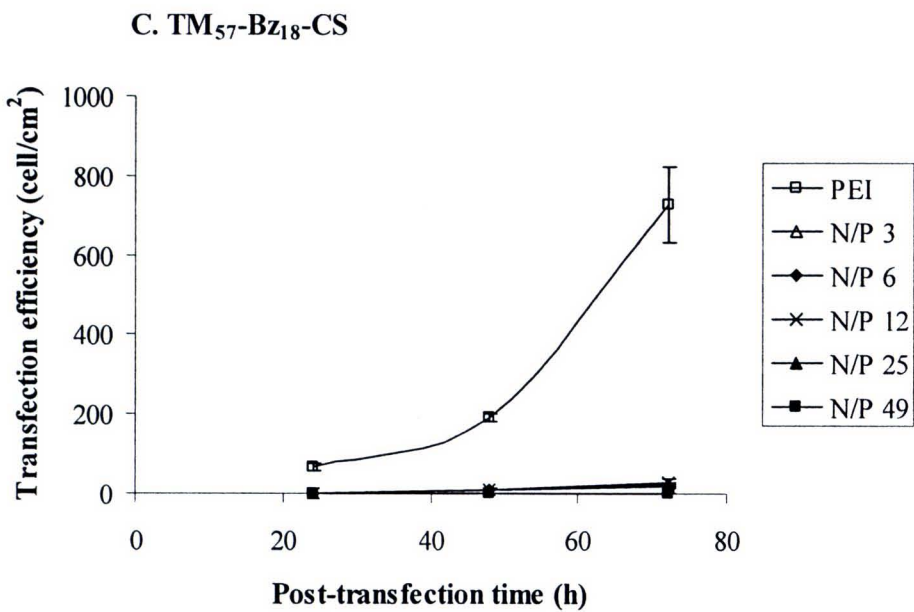
นำอนุพันธ์โคโคซานที่เตรียมได้มาคอมเพล็กซ์กับ plasmid DNA ที่อัตราส่วนต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาทีก่อนเติมในเซลล์เพาะเลี้ยง นำมาทดสอบการนำส่งยีนเข้าเซลล์เพาะเลี้ยง แล้วนำเซลล์มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนคือโปรตีนที่ผลิต enhanced green fluorescent protein (EGFP) โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ผลิต EGFP (จะเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์) โดยปรับค่า excitation wavelengths filter 480/40 และ emission filter 535/50 นำจำนวนเซลล์ที่เรืองแสงสีเขียวหารด้วยพื้นที่ของ 24- well plates คือ 1.9 ตารางเซนติเมตร ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 23-25 ส่วนรูปที่ 26 แสดงลักษณะการเรืองแสงสีเขียว รูปที่ 27-31 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน ที่ N/P ratios หลังจากเดิมสาร เป็นเวลา 3 วัน



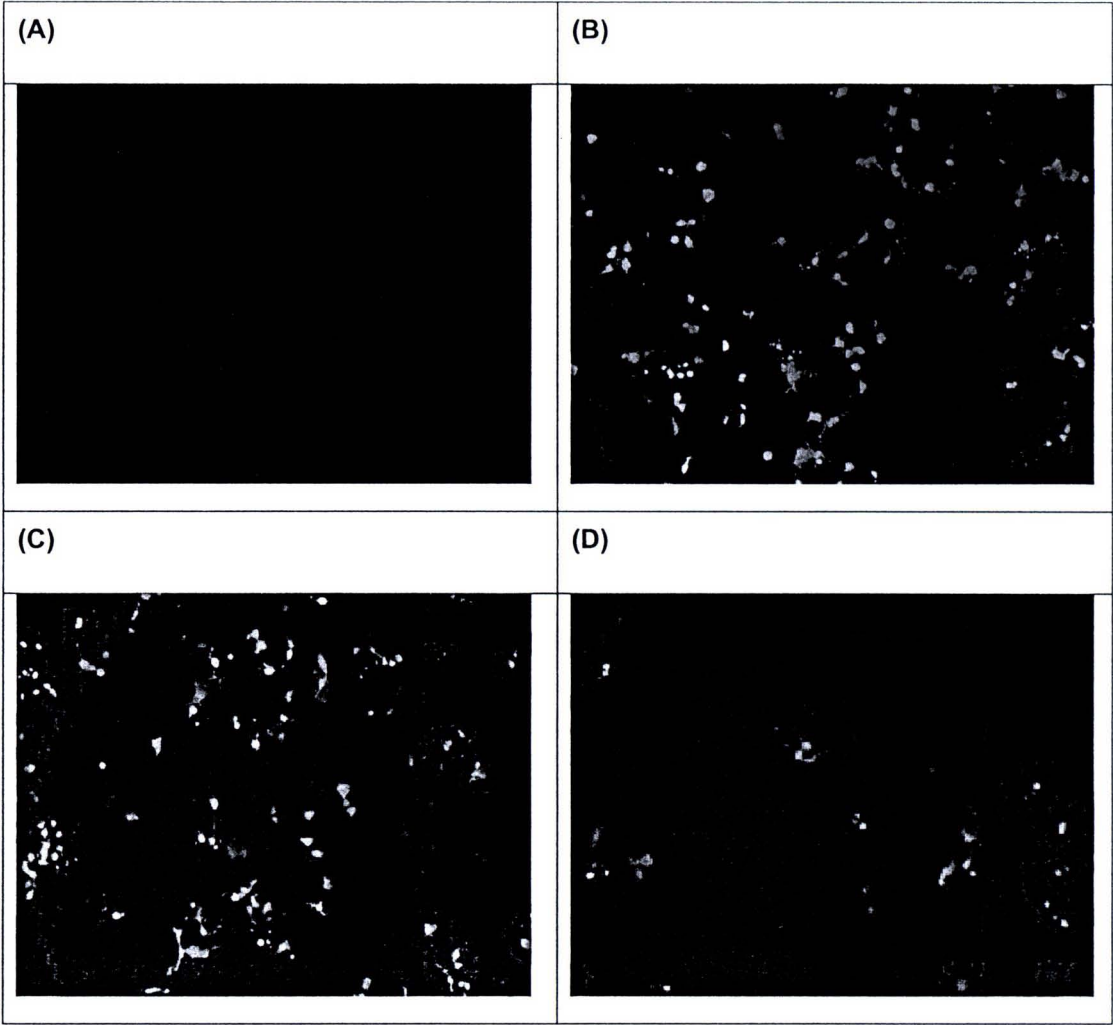
รูปที่ 23 แสดงผลของ post-transfection time of pDNA/TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes



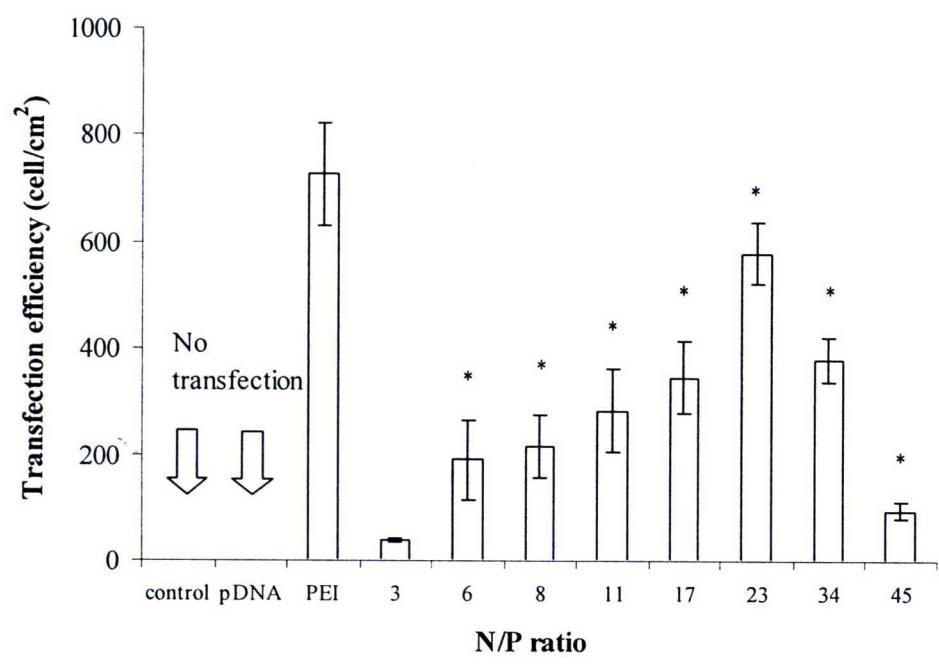
รูปที่ 24 แสดงผลของ post-transfection time of pDNA/TM₄₇-Bz₄₃-CS complexes



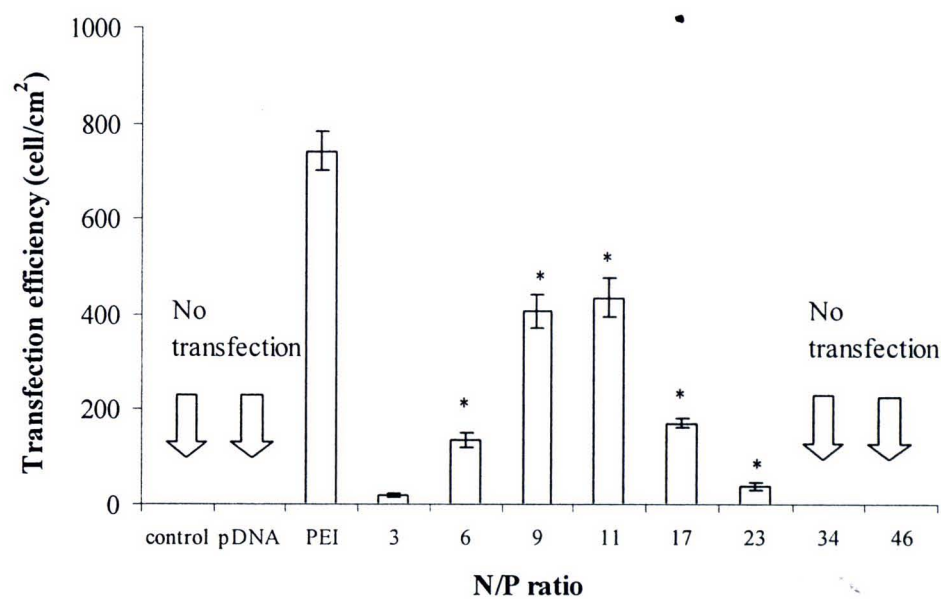
รูปที่ 25 แสดงผลของ post-transfection time of pDNA/TM₅₇-Bz₁₈-CS complexes



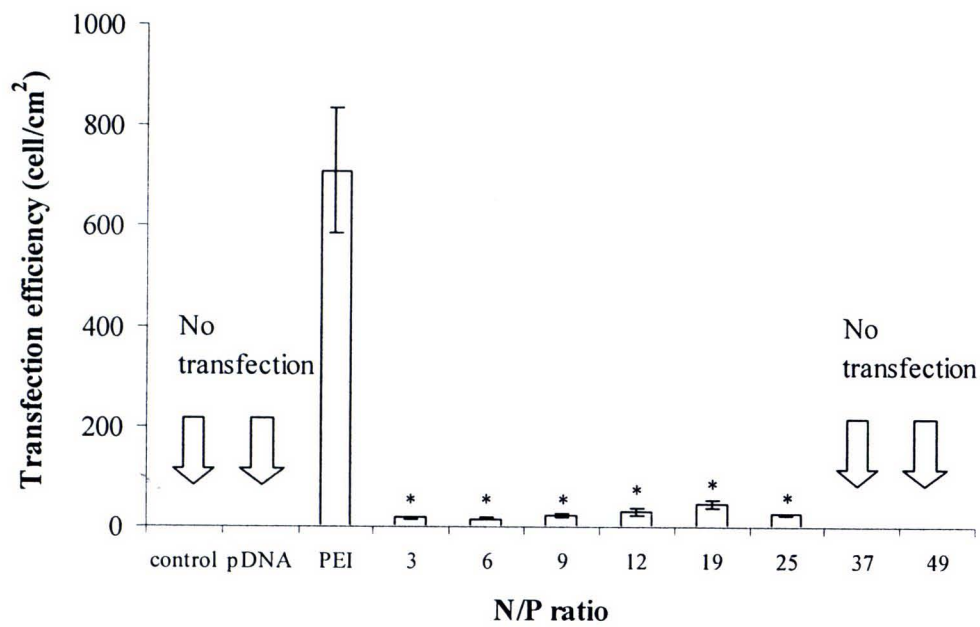
รูปที่ 26 Fluorescence images observations for pEGFP-C2 expression in Huh7 cells cultures using; (A) free pDNA, (B) pDNA/PEI complexes, (C) pDNA/TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes (N/P 23), (D) pDNA/TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes (N/P 3).



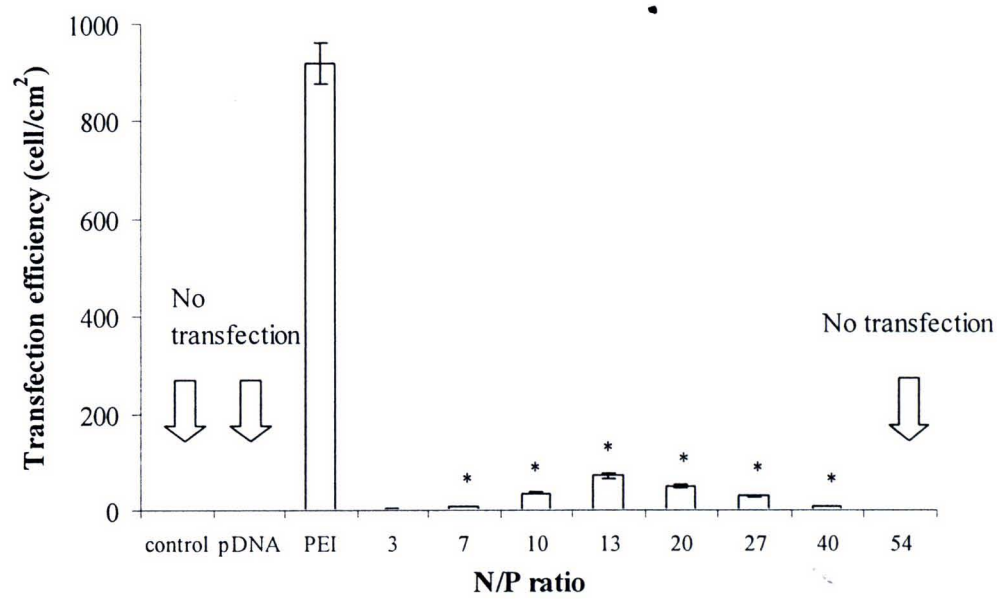
รูปที่ 27 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM₅₇-Bz₄₃-CS หลังจากเติมสาร เป็น เวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$).



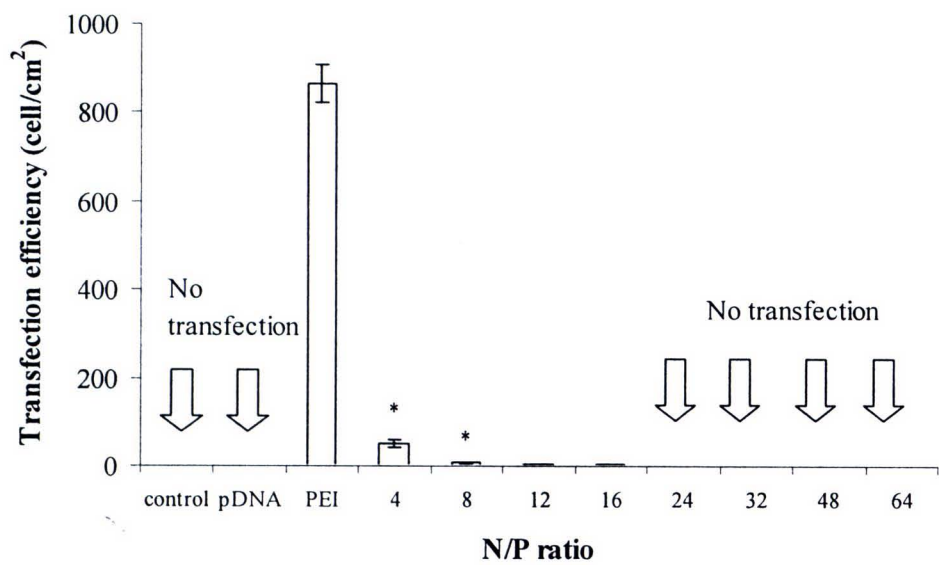
รูปที่ 28 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM₄₇-Bz₄₃-CS หลังจากเติมสาร เป็น เวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$).



รูปที่ 29 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM₅₇-BZ₁₈-CS หลังจากเติมสาร เป็น เวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$).

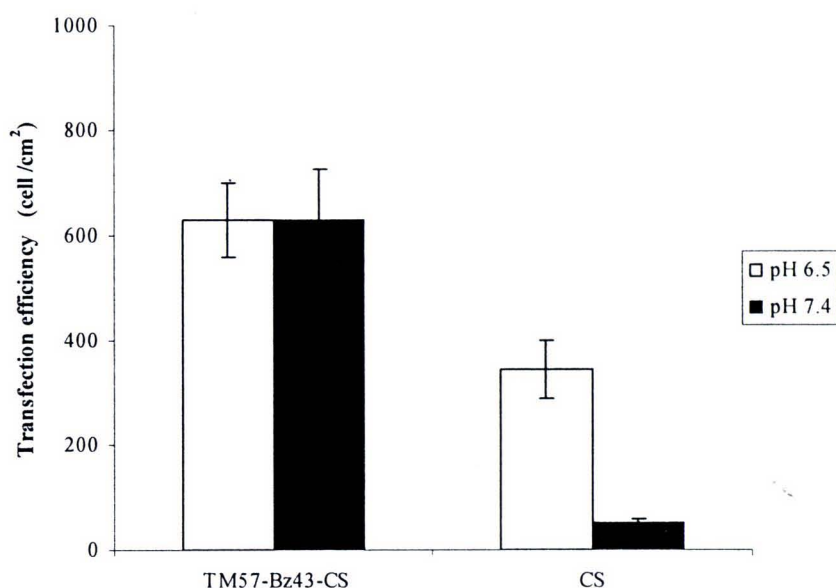


รูปที่ 30 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM₄₃-CS หลังจากเติมสารเป็นเวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$).



รูปที่ 31 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ CS หลังจากเติมสารเป็นเวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$).

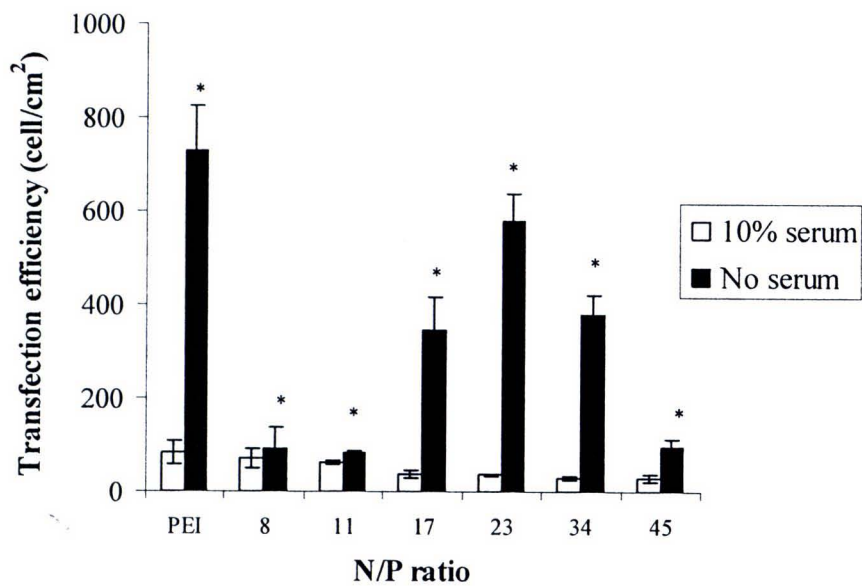
เนื่องจาก pH และ serum มีผลต่อประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของโคโคซาน ดังนั้น จึงทำการศึกษาผลของ pH และ serum ต่อประสิทธิภาพการแสดงออกของยีน ของ อนุพันธุ์โคโคซาน คือ TM₅₇-Bz₄₃-CS โดยศึกษาที่ N/P ratio ที่ให้การแสดงออกของยีนสูงที่สุด กล่าวคือ TM₅₇-Bz₄₃-CS ศึกษาที่ N/P ratio 23 เปรียบเทียบกับ โคโคซานเบส ศึกษาที่ N/P ratio 4 โดยศึกษาที่ pH 6.5 และ pH 7.4 ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 32 ส่วนผลของ serum แสดงในรูปที่ 33



รูปที่ 32 แสดงผลของ pH ของ culture medium ต่อ transfection efficiency ของ pDNA/TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes (N/P 23) และ pDNA/CS complexes (N/P 4).

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของ TM₅₇-Bz₄₃-CS ที่ pH 6.5 ไม่แตกต่างจาก pH 7.4 ซึ่งต่างจากประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของ โคโคซานเบส (CS) พบว่าที่ pH 6.5 ประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนสูงกว่าที่ pH 7.4 และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนระหว่าง TM₅₇-Bz₄₃-CS กับโคโคซานเบส พบว่า TM₅₇-Bz₄₃-CS มีประสิทธิภาพในการนำส่งยีนและเกิดการแสดงออกของยีนสูงกว่า โคโคซานเบสทั้ง pH 6.5 และ pH 7.4

ส่วนผลของ serum พบว่า เมื่อใส่ 10 % serum ในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าประสิทธิภาพการแสดงออกของยีนของ TM₅₇-Bz₄₃-CS ต่ำว่า เมื่อไม่ใส่ serum ผลการทดลองนี้เกิดขึ้นเช่นเดียวกับ PEI

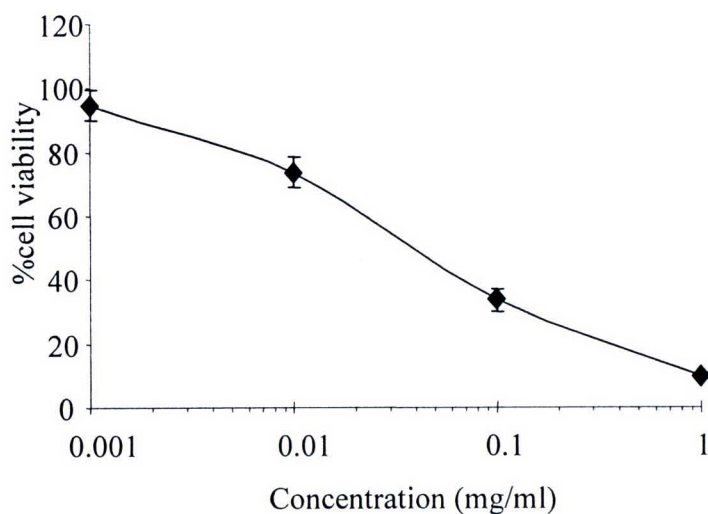


รูปที่ 33 แสดงผลของ serum ต่อ transfection efficiency ของ TM₅₇-Bz₄₃-CS/pDNA complexes และ PEI/pDNA complexes

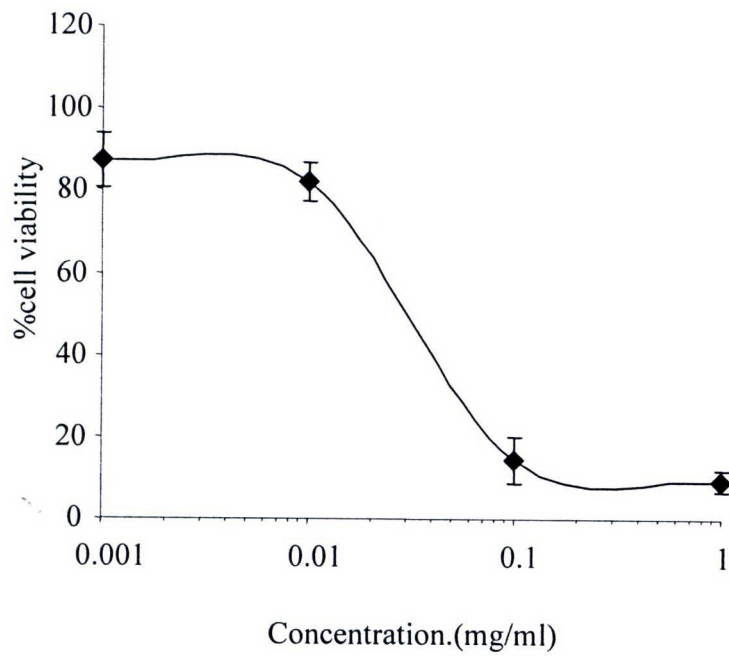
4. ทดสอบความเป็นพิษของอนุพันธ์โคโคซานที่สังเคราะห์ และ CS/ pDNA complexes

4.1 ศึกษาความเป็นพิษของอนุพันธ์โคโคซานที่สังเคราะห์ โดยวิธี MTT assay ดังนี้

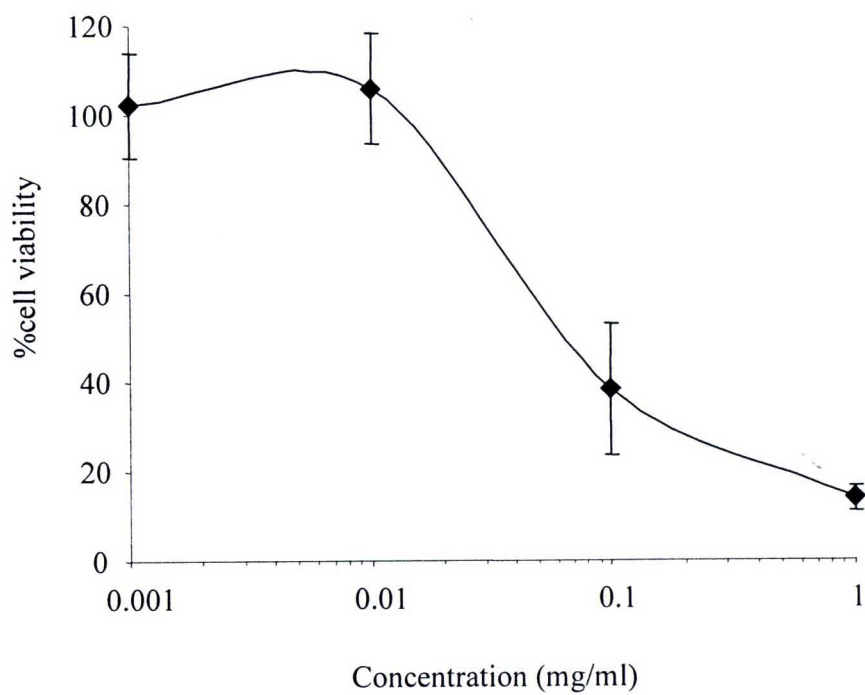
Huh7 cells ที่มีการเจริญเติบโตประมาณพื้นที่ 70-90% ของเพลท (70-90 % Confluence) โดยใช้เซลล์ 5×10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ถ่ายใส่ 96 well cell culture plates และ pre-incubated เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงก่อนทดสอบจากนั้นเติมอนุพันธ์โคโคซานที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือ pDNA/CS complexes ที่ N/P ต่างๆ หลังจากนั้นดูดสารละลายโคโคซานออก ล้างด้วย PBS 2 ครั้งและเปลี่ยนเป็น fresh cell culture medium และใส่ตู้บ่มเป็นเวลานาน 4 ชั่วโมงเพื่อรักษาสภาพเซลล์ นำเซลล์มาผสมกับ 20 ไมโครลิตร MTT (0.5 mg/มิลลิลิตร MTT in RPMI completed medium) เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง ขั้นตอนสุดท้ายให้ดูดสารละลายตัวกลางออกแล้วละลาย formazan crystal ด้วย 100 ไมโครลิตรของ DMSO ต่อหลุม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ผลของความเป็นพิษของอนุพันธ์โคโคซานที่สังเคราะห์ต่อเซลล์แสดงในรูปที่ 34-37 ผลของความเป็นพิษของโคโคซานเบส แสดงในรูปที่ 38 ผลของความเป็นพิษของ PEI แสดงในรูปที่ 39 และเปรียบเทียบค่าการรอดชีวิตสัมพัทธ์ที่ 50 % ในตารางที่ 7 ดังนี้ $CS < TM_{43}\text{-CS} < TM_{57}\text{-Bz}_{18}\text{-CS} < TM_{57}\text{-Bz}_{43}\text{-CS} < TM_{47}\text{-Bz}_{43}\text{-CS} < PEI$



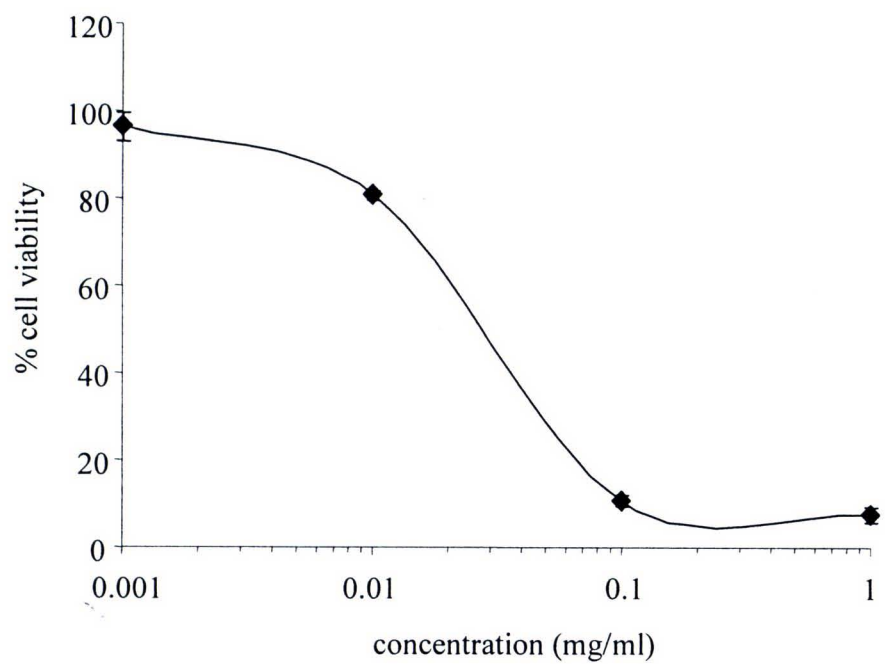
รูปที่ 34 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย $TM_{57}\text{-Bz}_{43}\text{-CS}$ ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ



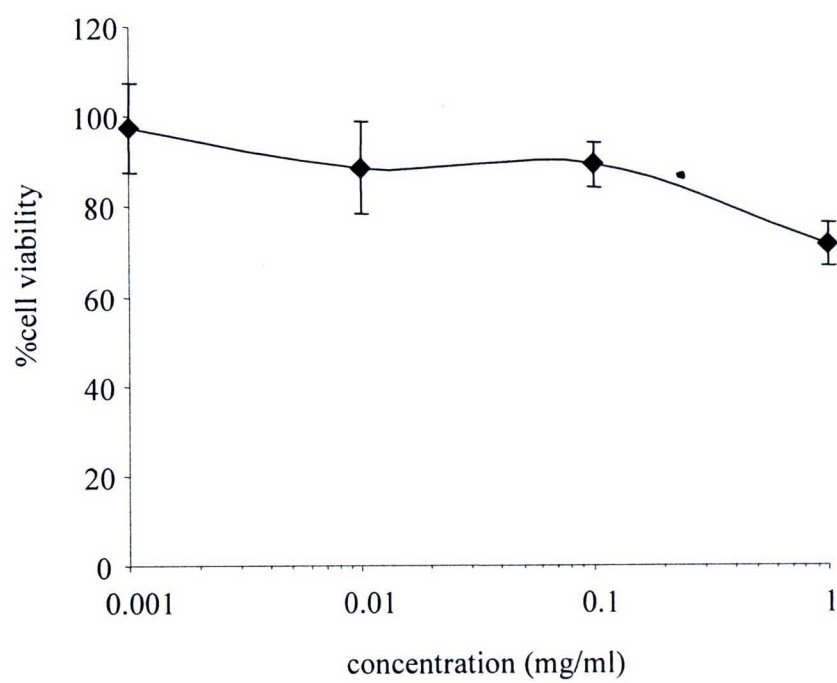
รูปที่ 35 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย TM₄₇-Bz₄₃-CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ



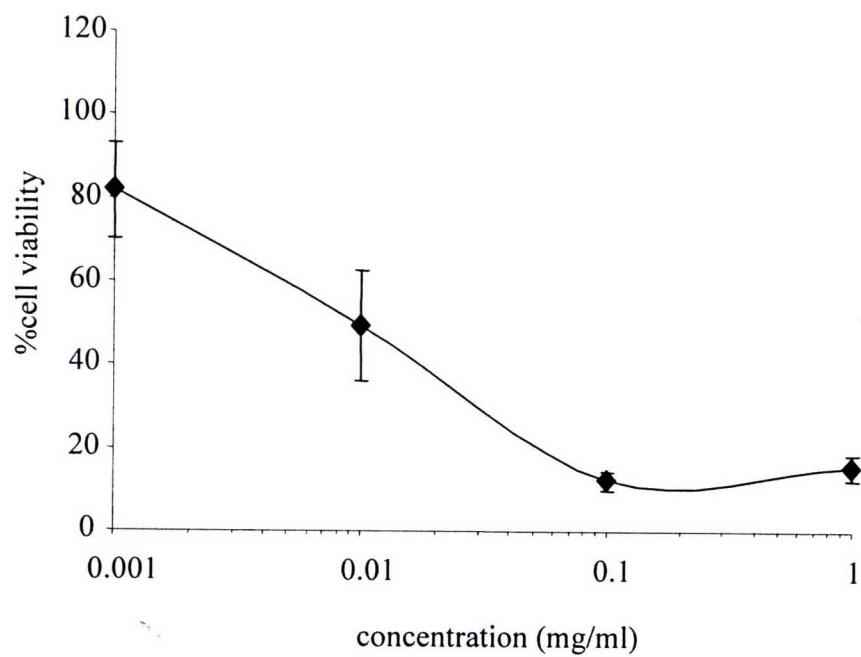
รูปที่ 36 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย TM₅₇-Bz₁₈-CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 37 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย TM₄₃-CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 38 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ



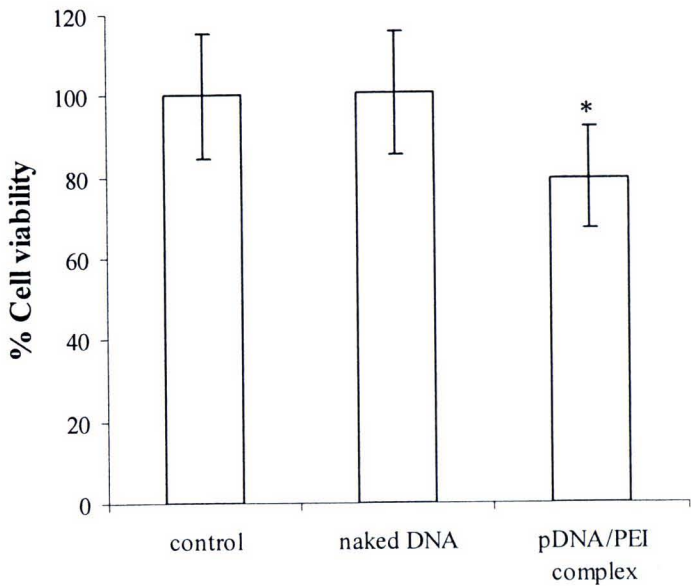
รูปที่ 39 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย PEI ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความเป็นพิษของอนุพันธ์โคโคซานที่สังเคราะห์ โคโคซานเบส และ PEI ในเซลล์Huh7

Samples	IC ₅₀ (µg/ml)
TM ₅₇ -Bz ₄₃ -CS (pH 7.3)	38
TM ₄₇ -Bz ₄₃ -CS (pH 7.3)	32
TM ₅₇ -Bz ₁₈ -CS (pH 7.4)	65
CS (pH 6.5)	> 1,000
PEI (pH 7.7)	10

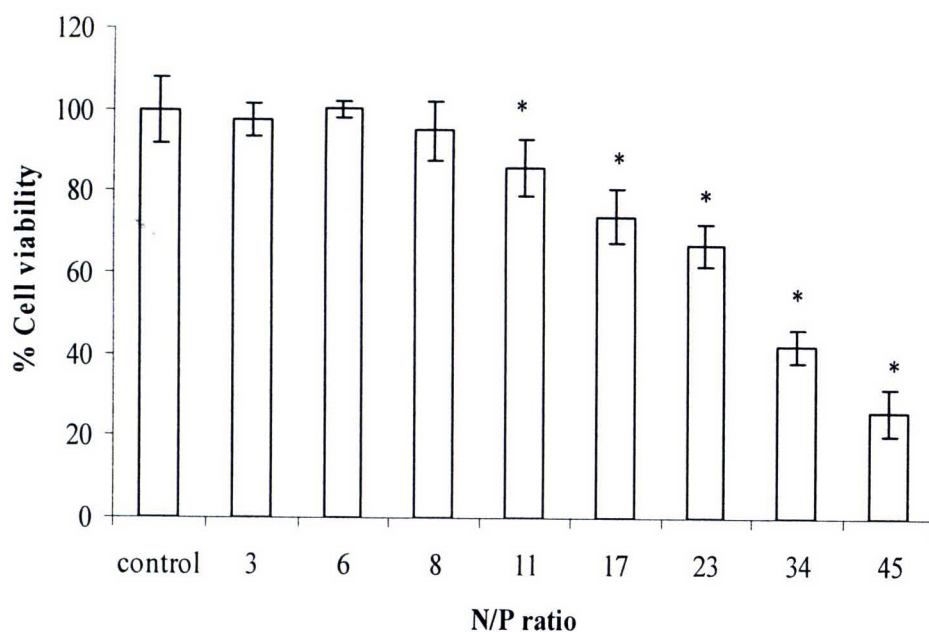
4.2 ศึกษาความเป็นพิษของ CS/ pDNA complexes

ผลการทดลองพบว่า plasmid DNA เปล่า ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ (% relative viability) ประมาณ 100 % แต่เมื่อนำ plasmid DNA มาคอมเพล็กซ์กับ PEI พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ประมาณ 80% เมื่อเทียบกับ pDNA/PEI complex เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแสดงดังรูปที่ 40

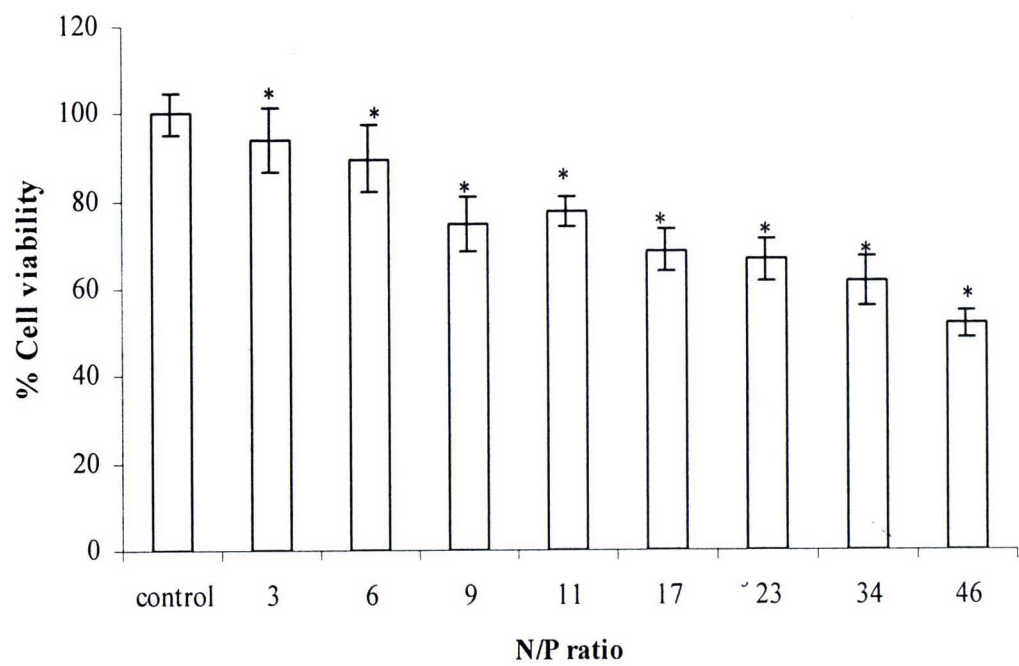


รูปที่ 40 ผลของ naked DNA และ pDNA/PEI complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.)

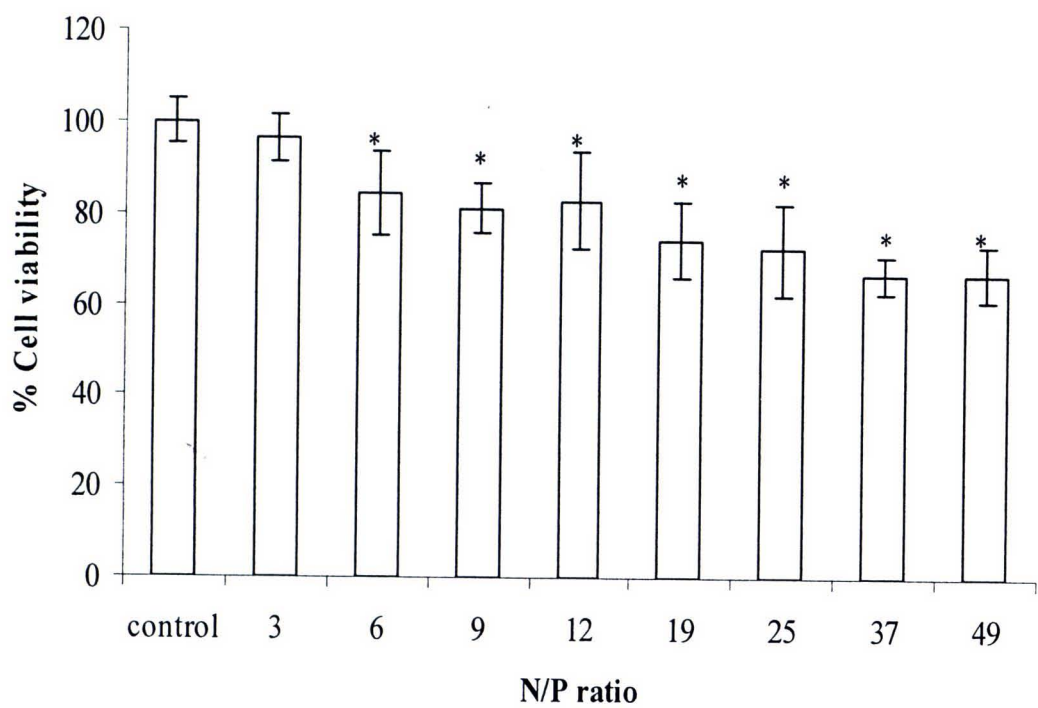
ผลของ pDNA/CS derivatives complexes ที่ N/P ต่างๆ ต่อค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 แสดง ในรูปที่ 41-43 ผลการทดสอบพบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ ของ pDNA/CS derivatives complexes complexes จะลดลงเมื่อ N/P ratio สูงขึ้น ส่วนผลของ pDNA/TM₄₃-CS complexes และ ผลของ pDNA/CS complexes ต่อ cell viability แสดงในรูปที่ 44 และรูปที่ 45 ตามลำดับ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ ของ pDNA/TM₄₃-CS complexes สูงกว่า pDNA/CS derivatives complexes complexes ส่วน ค่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสัมพันธ์ ของ pDNA/CS complexes จะสูงที่สุด



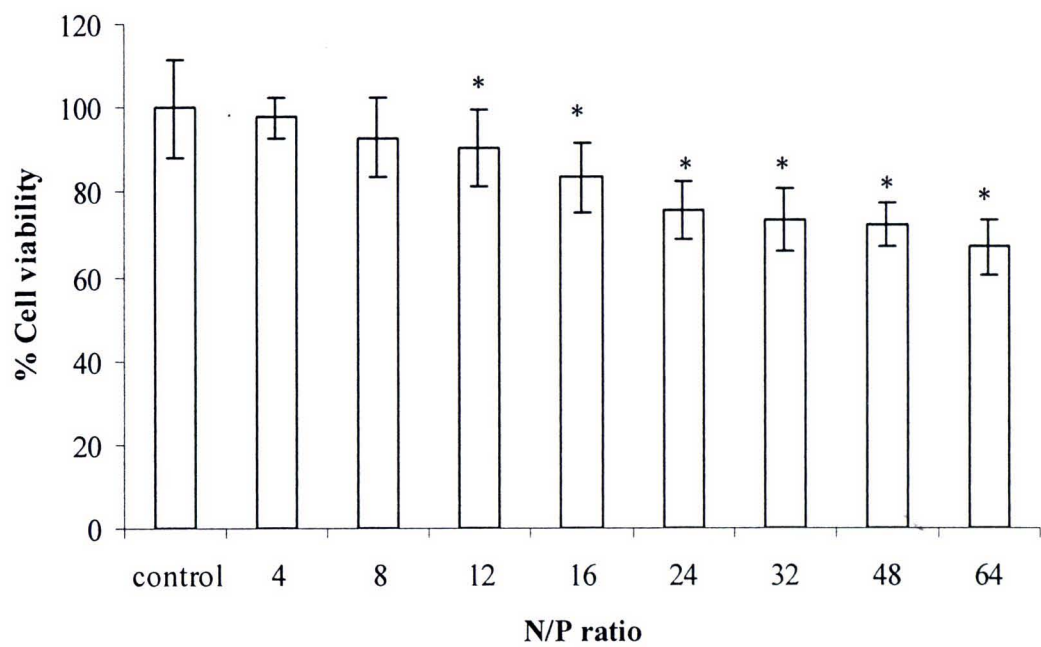
รูปที่ 41 ผลของ pDNA/TM₅₇-Bz₄₃-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.)



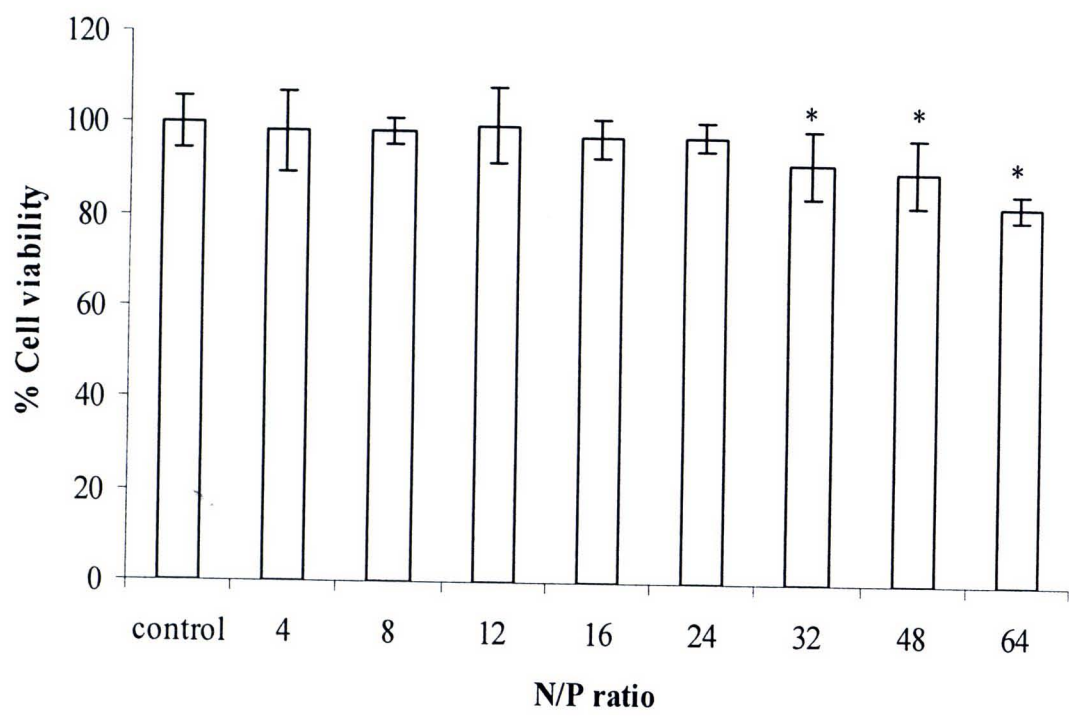
รูปที่ 42 ผลของ pDNA/TM₄₇-Bz₄₃-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.)



รูปที่ 43 ผลของ pDNA/TM₅₇-BZ₁₈-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.)



รูปที่ 44 ผลของ pDNA/TM₄₃-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.)



รูปที่ 45 ผลของ pDNA/CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.)