DBG5180005 ภญ.รศ.ดร. ปราณีต โอปณะโสภิต

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246855

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาอนุภาคระดับนาโนสำหรับนำส่งยีน

โดย ภญ.รศ.ดร. ปราณีต โอปณะโสภิต และ คณะ

เมษายน 2554

b00251293
246855
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246855

สัญญาเลขที่ DBG 5180005

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาอนุภาคระดับนาโนสำหรับนำส่งยีน

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. รศ.ดร. ปราณีต โอปณะโสภิต	มหาวิทยาลัยศิลปา
2. รศ.ดร. ธีรศักดิ์ โรจนราธา	มหาวิทยาลัยศิลปากร
3.ดร. วรายุทธ์ สะโจมแสง	ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำวิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ซึ่งให้การสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยนี้ และขอขอบคุณ ดร. อุรชา รักษ์ตานนท์ชัย ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ในการวัดประจุและขนาดอนุภาค และการใช้เครื่อง atomic force microscope (AFM) ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ในความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สำหรับการวิจัย

คณะผู้ทำวิจัย

บทคัดย่อภาษาไทย

รหัสโครงการ DBG518005

ชื่อโครงการวิจัย การพัฒนาอนุภาคระดับนาโนสำหรับนำส่งยีน

ชื่อผู้วิจัยและสถาบัน รศ.ดร. ปราณีต โอปณะโสภิต

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร praneet@su.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี (1 พค 2551 ถึง 30 เมษายน 2554)

246855

บทคัดย่อ

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกชนิดหนึ่งที่เสื่อมสลายได้ภายในร่างกายและสามารถนำมาใช้เป็นตัวพาในการนำส่งยีนได้ แต่ข้อจำกัดของไคโตซานคือมีการละลายน้ำต่ำในพีเอชที่เป็นกลางและประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงต่ำ การสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคโตซานชนิดใหม่โดยปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานขึ้นนี้เพื่อเพิ่มการละลายและประสิทธิภาพของไคโตซานในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงและศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ได้แก่ ควอเทอร์ไนซ์ เอ็น-(4-เอ็น, เอ็น-ได เมทิลอะมิโนเบนซิล) ไคโตซาน (TM-Bz-CS) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้แก่ อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อดีเอ็นเอ ขนาดอนุภาค ประจุบนพื้นผิวอนุภาค รูปร่างอนุภาค พีเอชของอาหารเลี้ยงเซลล์ และซีรัม เป็นต้น พลาสมิดที่ใช้ศึกษาครั้งนี้คือพลาสมิดที่สามารถแปลรหัสได้เป็น green fluorescence protein (pEGFP-C2) เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้คือ human hepatoma cell lines (Huh7 cells) โดยศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของอนุพันธ์ไคโตซานเปรียบเทียบกับพีอีไอ ผลการศึกษาพบว่าอนุพันธ์ไคโตซานทุกตัวสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอได้ โดยประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อดีเอ็นเอ กล่าวคือเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อดีเอ็นเอ ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจะเพิ่มสูงขึ้น และประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีหมู่ที่ไม่ชอบน้ำอยู่ในสูตรโครงสร้าง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของอนุพันธ์ไคโตซานพบว่า TM_{57}-Bz_{43}-CS > TM_{47}-Bz_{43}-CS > TM_{57}-Bz_{18}-CS การเพิ่มปริมาณหมู่เบนซิลจะเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อศึกษาผลของพีเอชของอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่า พีเอชไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของ TM_{57}-Bz_{43}-CS แต่มีผลต่อไคโตซานเบส จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่า TM_{57}-Bz_{43}-CS เป็นตัวพายีนที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอได้และให้การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงที่สูงที่สุด รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ Huh7 ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพีอีไอ

กุญแจคำ ระบบนำส่งยีน ตัวพายีนที่ไม่ใช่ไวรัส อนุพันธ์ไคโตซาน

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Project code DBG518005

Research Title: Development of nanoparticles for gene delivery

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Praneet Opanasopit

Faculty of Pharmacy, Silpakorn University, praneet@su.ac.th

Project period: 3 years (1 May 2008- 30 April 2011)

246855

Abstract

Chitosan (CS) is a biodegradable polymer and can be used as carriers in gene delivery. However the major drawback of CS is low solubility in neutral pH values and low transfection efficiency. To improve the solubility and transfection efficiency, novel CS derivatives were synthesized by modifying the chemical structure of CS. The purpose of this study was to investigate the transfection efficiencies and cytotoxicity of three different types of this novel synthesized (Quaternized N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan; TM-Bz-CS. The factors affecting the transfection efficiency such as N/P ratio, particle size, zeta-potential, morphology, pH of culture medium and serum have been evaluated. Transfection efficiency was investigated using the plasmid DNA encoding green fluorescence protein (pEGFP-C2) on human hepatoma cell lines (Huh7 cells), compared with polyethylenimine (PEI, 25 kDa). The results revealed that all CS derivatives were able to condense with pDNA. The gene transfection efficiencies were influenced by the N/P ratios. When the N/P ratio increased, the gene expression increased. The gene transfection increased, when CS was substituted with hydrophobic group. The rank of transfection efficiency of the CS derivatives were TM_{57}-Bz_{43}-CS > TM_{47}-Bz_{43}-CS > TM_{57}-Bz_{18}-CS. When the amount of N-benzyl substituted group increased, the gene expression increased. The pH of culture medium did not affect the transfection efficiency of pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complex, whereas affected to CS. TM_{57}-Bz_{43}-CS showed elevated potential as gene carrier by efficient DNA condensation and mediated highest level of gene transfection with negligible cytotoxicity in Huh7 cells in comparison to PEI.

Key words: gene delivery system, non-viral gene carrier, chitosan derivatives

Executive Summary

1. รหัสโครงการ DBG518005
2. ชื่อโครงการ การพัฒนาอนุภาคระดับนาโนสำหรับนำส่งยีน
   Development of nanoparticles for gene delivery
3. คณะผู้วิจัย
   1. ภญ.รศ.ดร.ปราณีต โอปณะโสภิต (หัวหน้าโครงการ)
   2. ภก.รศ.ดร. ธีรศักดิ์ โรจนราธา (ผู้ร่วมวิจัย)
   3. ดร. วรายุทธ์ สะโจมแสง (ผู้ร่วมวิจัย)
4. สถาบันต้นสังกัด/สถานที่ติดต่อ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
5. ระยะเวลาโครงการ 3 ปี
6. งบประมาณโครงการ 1,200,00 บาท
7. บทสรุปโครงการวิจัย

ไคโตซานเป็นพอลีแซคคาไรด์จากธรรมชาติ หน่วยย่อยของไคโตซาน คือ D-glucosamine ไคโตซานมีคุณสมบัติที่ดีคือสามารถเข้าได้กับสารในร่างกาย (biocompatibility) มีความเป็นพิษต่ำ ราคาไม่แพง และสามารถสลายตัวได้ (biodegradation) แต่เนื่องจากไคโตซานมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (มีค่า pKa 6.5) แต่ละลายได้ดีในสารละลายกรดอ่อน (pH 1-6) เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้นุ จึงไม่สะดวกในการนำมาใช้ประโยชน์ ลักษณะเด่นของไคโตซานคือเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดแตกตัวให้ประจุบวกจึงสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอซึ่งมีประจุลบได้อนุภาคที่มีขนาดในระดับนาโนเมตร แต่ให้ประสิทธิภาพในการนำส่งยีนและการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์ต่ำ รายงานการใช้อนุพันธ์ไคโตซานในรูปที่ละลายน้ำดีนั้นมีรายงานน้อยมาก มีเพียงรายงานเดียวที่ใช้ Trimethylated chitosans ซึ่งอนุพันธ์ที่ได้มีความสะดวกในการใช้งานสามารถละลายน้ำได้ และอนุพันธ์ไคโตซานประจุบวกนี้จึงมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นตัวพายีนเข้าสู่เซลล์เป้าหมายที่ต้องการได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อหาอนุพันธ์ของไคโตซานชนิดละลายน้ำดี เป็นตัวนำส่งยีนเข้าเซลล์และมีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์สูง โดยศึกษาความเป็นไปได้และปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการแสดงออกของยีน การสังเคราะห์อนุพันธ์ของไคโตซานชนิดใหม่โดยปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานขึ้นนี้เพื่อเพิ่มการละลายและประสิทธิภาพของไคโตซานในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงและศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ ได้แก่ ควอเทอร์ไนซ์ เอ็น-(4-เอ็น, เอ็น-ไดเมทธิลอะมิโนเบนซิล) ไคโตซาน (TM-Bz-CS) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงได้แก่ อัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อดีเอ็นเอ ขนาดอนุภาค ประจุบนพื้นผิวอนุภาค รูปร่างอนุภาค พีเอชของอาหารเลี้ยงเซลล์ และซีรัม เป็นต้น พลาสมิดที่ใช้ศึกษาครั้งนี้คือ

พลาสมิดที่สามารถแปลรหัสได้เป็น green fluorescence protein (pEGFP-C2) เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้คือ human hepatoma cell lines (Huh7 cells) โดยศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของอนุพันธ์ไคโตซานเปรียบเทียบกับพีอีไอ ผลการศึกษาพบว่าอนุพันธ์ไคโตซานทุกตัวสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอได้ โดยประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงขึ้นกับอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อดีเอ็นเอ กล่าวคือเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างพอลิเมอร์ต่อดีเอ็นเอ ประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจะเพิ่มสูงขึ้น และประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีหมู่ที่ไม่ชอบน้ำอยู่ในสูตรโครงสร้าง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของอนุพันธ์ไคโตซานพบว่า TM_{57}-Bz_{43}-CS > TM_{47}-Bz_{43}-CS > TM_{57}-Bz_{18}-CS การเพิ่มปริมาณหมู่เบนซิลจะเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อศึกษาผลของพีเอชของอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่า พีเอชไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงของ TM_{57}-Bz_{43}-CS แต่มีผลต่อไคโตซานเบส จากผลการศึกษาทั้งหมดพบว่า TM_{57}-Bz_{43}-CS เป็นตัวพายีนที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับดีเอ็นเอได้และให้การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงที่สูงที่สุด รวมทั้งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ Huh7 ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพีอีไอ

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
Executive Summary	iv
สารบัญเรื่อง	vi
สารบัญตาราง	vii
สารบัญรูป	viii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	xi
บทที่ 1 บทนำ	1
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	5
- สารเคมี	5
- อุปกรณ์	7
- ระเบียบวิธีวิจัย	9
บทที่ 3 ผลการวิจัย	20
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	61
เอกสารอ้างอิง	64
ผลรับที่ได้จากโครงการ	66
ภาคผนวก	69

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	Composition of buffers for QIAGEN® Plasmid Midi Kits	6
ตารางที่ 2	แสดงเปอร์เซ็น quaternization ของอนุพันธ์ไคโตซาน TM-Bz-CS	12
ตารางที่ 3	แสดง F.W. ของอนุพันธ์ไคโตซาน	14
ตารางที่ 4	แสดงปริมาณ CS (μg) ต่อ ปริมาณ DNA (μg) และ N/P ratio	15
ตารางที่ 5	The N-benzylation of chitosan	22
ตารางที่ 6	สรุป N/P ratio ที่เกิดคอมเพล็กส์สมบูรณ์ ของไคโตซานเบสและอนุพันธ์ไคโตซาน	30
ตารางที่ 7	เปรียบเทียบความเป็นพิษของอนุพันธ์ไคโตซานที่สังเคราะห์ ไคโตซานเบส และ PEI ในเซลล์ Huh7	55

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงสูตรโครงสร้างของไคตินและไคโตซาน	3
รูปที่ 2	แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan	10
รูปที่ 3	แสดงขั้นตอนการสังเคราะห์อนุพันธ์ไคโตซาน trimethylated N-(4-N,N-dimethylamino benzyl) chitosan	11
รูปที่ 4	แสดง Huh7 cells ที่เพาะเลี้ยงใน TC-flask ขนาด 75 cm^2 (image 10× objective using an inverted microscope)	19
รูปที่ 5	FT-IR (KBr) spectra of TM_{43}-CS	20
รูปที่ 6	^{1}H-NMR spectra ของ CS (D_2O/CF_3COOD)	21
รูปที่ 7	^{1}H-NMR spectra ของ TM_{43}-CS (D_2O/CF_3COOD)	21
รูปที่ 8	FT-IR (KBr) spectra of CS and DM-Bz-CS	23
รูปที่ 9	แสดง ^{1}H-NMR spectra ของ CS และ DM-Bz-CS (D_2O/CF_3COOD)	24
รูปที่ 10	FT-IR (KBr) spectra ของ TM-Bz-CS	25
รูปที่ 11	^{1}H-NMR spectra ของ methylated N-(4-N,N-dimethylaminobenzyl) chitosan (ES=42.5%) in D_2O	26
รูปที่ 12	แสดง agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA และ TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes ที่ N/P ratios ต่าง ๆ โดย Lane 1: DNA marker, lane 2: plasmid DNA (0.5 μg) and lane 3-8: TM_{57}-Bz_{43}-CS/DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 0.7, 1.5, 3, 6, 8 และ 11 ตามลำดับ	27
รูปที่ 13	แสดง agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA และ TM_{47}-Bz_{43}-CS complexes ที่ N/P ratios ต่าง ๆ โดย Lane 1: DNA marker, lane 2: plasmid DNA (0.5 μg) and lane 3-8: TM_{47}-Bz_{43}-CS/DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 0.7, 1.5, 3, 6, 9 และ 11 ตามลำดับ	28
รูปที่ 14	แสดง agarose gel electrophoresis ของ plasmid DNA และ TM_{57}-Bz_{18}-CS complexes ที่ N/P ratios ต่าง ๆ โดย Lane 1: DNA marker, lane 2: plasmid DNA (0.5 μg) and lane 3-8: TM_{57}-Bz_{18}-CS/DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 0.8, 1.5, 3, 6, 9 และ 12 ตามลำดับ	29
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 μg) and lane 3-8: CS /DNA complexes ที่ N/P ratios คือ 1, 2, 4, 8,	31

12 และ 16 ตามลำดับ
รูปที่ 16 The particle size and zeta-potential of DNA / TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes at various N/P ratio 31
รูปที่ 17 The particle size and zeta-potential of DNA/TM_{47}-Bz_{43}-CS complexes at various N/P ratio 32
รูปที่ 18 The particle size and zeta-potential of DNA / TM_{57}-Bz_{18}-CS complexes at various N/P ratio 33
รูปที่ 19 The particle size and zeta-potential of DNA/CS complexes at various N/P ratio 34
รูปที่ 20 The planar and three-dimensional AFM images of pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes (N/P 23); (A) planar images; (B) three-dimensional image. 35
รูปที่ 21 The planar and three-dimensional AFM images of pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes (N/P 3); (A) planar images; (B) three-dimensional image. 36
รูปที่ 22 The planar and three-dimensional AFM images of pDNA/PEI complexes (1/1 weight ratio); (A) planar images; (B) three-dimensional image 37
รูปที่ 23 แสดงผลของ post-transfection time of pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes 38
รูปที่ 24 แสดงผลของ post-transfection time of pDNA/TM_{47}-Bz_{43}-CS complexes 39
รูปที่ 25 แสดงผลของ post-transfection time of pDNA/TM_{57}-Bz_{18}-CS complexes 40
รูปที่ 26 Fluorescence images observations for pEGFP-C2 expression in Huh7 cells cultures using; (A) free pDNA, (B) pDNA/PEI complexes, (C) pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes (N/P 23), (D) pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes (N/P 3) 41
รูปที่ 27 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM_{57}-Bz_{43}-CS หลังจากเติมสาร เป็นเวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$) 42
รูปที่ 28 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM_{47}-Bz_{43}-CS หลังจากเติมสาร เป็นเวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$) 43
รูปที่ 29 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM_{57}-Bz_{18}-CS หลังจากเติมสาร เป็นเวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$) 44
รูปที่ 30 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ TM_{43}-CS หลังจากเติมสารเป็นเวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$). 45
รูปที่ 31 แสดงผลของ N/P ratio ต่อ transfection efficiency ของ CS หลังจากเติมสารเป็นเวลา 3 วัน (* indicate $p \leq 0.05$). 46
รูปที่ 32 แสดงผลของ pH ของ culture medium ต่อ transfection efficiency ของ pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes (N/P 23) และ pDNA/CS complexes 47

(N/P 4)
รูปที่ 33 แสดงผลของ serum ต่อ transfection efficiency ของ TM_{57}-Bz_{43}-CS/pDNA complexes และ PEI/pDNA complexes 48
รูปที่ 34 แสดงค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย TM_{57}-Bz_{43}-CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 49
รูปที่ 35 แสดงค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย TM_{47}-Bz_{43}-CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 50
รูปที่ 36 แสดงค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย TM_{57}-Bz_{18}-CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 51
รูปที่ 37 แสดงค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย TM_{43}-CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 52
รูปที่ 38 แสดงค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย CS ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 53
รูปที่ 39 แสดงค่าเปอร์เซนต์การรอดชีวิตสัมพัทธ์ (% relative viability) ของเซลล์ Huh7 เมื่อทดสอบด้วย PEI ที่เตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ 54
รูปที่ 40 ผลของ naked DNA และ pDNA/PEI complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.) 55
รูปที่ 41 ผลของ pDNA/TM_{57}-Bz_{43}-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.) 56
รูปที่ 42 ผลของ pDNA/TM_{47}-Bz_{43}-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.) 57
รูปที่ 43 ผลของ pDNA/TM_{57}-Bz_{18}-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.) 58
รูปที่ 44 ผลของ pDNA/TM_{43}-CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.) 59
รูปที่ 45 ผลของ pDNA/CS complexes ต่อ cell viability (* indicated $p < 0.05$.) 60

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

^{o}C	=	degree celsius
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
%	=	percent
%v/v	=	percent volume by volume
%w/w	=	percent weight by weight
AFM	=	atomic force microscope
ANN	=	artificial neural network
ATCC	=	American Type Culture Collection
cm^2	=	square centimeter
CS	=	chitosan
Da	=	dalton
DD	=	degree of deacetylation
DM-Bz-CS	=	*N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl) chitosan
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxy ribonucleic acid
DQ_{CS}	=	degree of quaternization of glucosamine residue of chitosan
DQ_T	=	total degree of quaternization
DS	=	degree of substitution
DSC	=	differential scanning calorimetry
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
e.g.	=	example given, for example
ES	=	extent of *N*-substitution
FBS	=	fetal bovine serum

FTIR	=	fourier transform infrared spectroscopy
G	=	gram
GlcN	=	β-(1→4)-2-amino-2-deoxy-*D*-glucopyranose
GlcNAc	=	β-(1→4)-2-acetamido-2-deoxy-*D*-glucopyranose
GFP	=	green fluorescent protein
h	=	hour
Huh 7 cells	=	human hepatocellular liver carcinoma cell line
IC_{50}	=	the concentration produced 50% inhibition of the dehydrogenase activity
kDa	=	kilo-Daltons
L	=	litre
M	=	molar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
MTT	=	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
MW	=	molecular weight
N/P ratio	=	ratio of positively charged chitosan to negatively charged DNA
PAMAM	=	polyamidoamine dendrimers
PBS	=	phasphate buffer saline
pEGFP	=	plasmid DNA encoding green fluorescent protein
PEI	=	polyethyleneimine
pH	=	potentia hydrogenii (lat.)
PIC	=	polyion complexes
pK_a	=	coefficient for the acidity of a substance
PLL	=	polylysine

RNA	=	ribonucleic acid
SD	=	standard deviation
SEM	=	scanning electron micrographs
TBE	=	Tris buffer EDTA
TC	=	tissue culture
TM-Bz-CS	=	quaternized *N*-(4-*N*,*N*-dimethylaminobenzyl) chitosan
TM-CS	=	*N*,*N*,*N*-trimethylammonium chitosan chloride