

Evaluation of the effect of nanocomposites based on magnetic nanoparticles on wound healing

Elham Maghareh Abed¹, Fatemeh Yazdian^{1,2*}, Abbas Akhavan Sepahi¹, Behnam Rasekh³

1. Department of Microbiology, Faculty of biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Environment & Biotechnology Research Division, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: Skin is a soft tissue that protects the whole body and internal tissues against external hazards such as burns or injuries. Risks cause loss of the skin's defense mechanism and severe infections and wounds that inhibit the healing. Therefore, it is very important to develop effective and fast skin repair. The aim of this study was to prepare a porous scaffold for wound covering made of Polycaprolactone (PCL), the core of this scaffold is made of Carbon Quantum Dot (CQDs), Iron nanoparticles (Fe), and Chitosan (Cs).

Materials and Methods: The composition of Fe-CQDs was synthesized by ammonium-hydrogen-citrate under hydrothermal conditions and Poly capro lactone/Chitosan/Carbon-quantum dot-iron scaffold by electrospinning method. The synthesized scaffolds were evaluated for morphology, functional groups, structure, and composition by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), and X-ray Powder Diffraction (XRD) analyses, respectively. After characterizing the fabricated scaffold, the viability of L929 fibroblast stem cells was obtained.

Results: SEM results showed successful integration of polycaprolactone scaffold with chitosan and carbon-iron quantum dot-iron. The average size of polycaprolactone/Chitosan/Carbon-quantum dot-iron nanocomposite was in the range of 32.6-135.0 nm. FTIR results showed the formation of bonds between carbonate and iron nanoparticles. A vibrating magnetometer (VSM) proved superparamagnetic of carbon-quantum dot-iron magnetic nanoparticles. At a concentration of 2% carbon-quantum dot-iron, the scaffold had good biocompatibility, which was proved by a cytotoxicity test.

Conclusion: The results showed that Polycaprolactone /Chitosan /Carbon-quantum dot-iron (PCL/Cs/CQD-Fe) nanocomposite improves the wound healing process due to its non-toxicity. The biocompatible PCL/Cs/ CQD-Fe nanocomposite is a scaffold of interest in wound dressing that greatly accelerates the skin regeneration process.

Keywords: Carbon Quantum Dot, Wound healing, Poly Capro Lactone (PCL), Magnetic nanoparticles, Toxicity, Iau Science

Corresponding author:

1. Department of Microbiology, Faculty of biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Life Science Engineering, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

Email: Yazdian@ut.ac.ir

ارزیابی تاثیر نانوکامپوزیت مبتنی بر نانوذرات مغناطیسی در ترمیم زخم

الهام مقاره عابد^۱، فاطمه یزدیان^{۱*}، عباس اخوان سپه‌ای^۱، بهنام راسخ^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳. پژوهشکده محیط زیست و بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پوست بافت نرمی است که کل بدن و بافت‌های داخلی را در مقابل خطرات بیرونی مانند سوختن یا جراحی محافظت می‌نماید. خطرات باعث از بین رفتن ساز و کار دفاعی پوست و عفونت‌های شدید و زخم می‌شود که عامل بازدارنده فرآیند ترمیم هستند. بنابراین توسعه ترمیم موثر و سریع پوست، بسیار مهم است. هدف از این پژوهش تهیه یک داربست متخلخل برای پوشش زخم از جنس پلی‌کاپرولاکتون (PCL)، است که هسته این داربست از کربن کوانتوم‌دات (CQDs)، نانوذرات آهن (Fe) و کیتوزان (Cs) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ترکیب Fe-CQDs با استفاده از آمونیوم هیدروژن سترات در شرایط هیدروترمال و داربست پلی-کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن کوانتوم دات-آهن به روش الکتروسی سنتز شد. داربست سنتز شده از نظر مورفولوژی، گروه‌های عاملی، ساختار و ترکیب به ترتیب با آنالیزهای طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و پراش پرتو ایکس (XRD) بررسی شد. پس از مشخصه‌یابی داربست ترکیبی ساخته شده، بررسی سمیت سلول‌های بنیادی فیبروبلاست L929 به دست آمد.

یافته‌ها: نتایج SEM نشان‌دهنده ادغام موفق داربست پلی‌کاپرولاکتون با کیتوزان و کربن کوانتوم دات-آهن بود. میانگین سایز نانوکامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن کوانتوم دات-آهن در محدوده ۱۳۵/۰-۳۲/۶ nm بدست آمد. نتایج FTIR تشکیل پیوند نانوذرات کربن دات و آهن را نشان داد. مغناطیس سنج ارتعاشی (VSM)، سوپرپارامغناطیس بودن نانوذرات مغناطیسی کربن کوانتوم دات-آهن را اثبات نمود. در غلظت ۰/۲٪ از کربن کوانتوم دات-آهن، داربست زیست‌سازگاری مناسبی داشت که توسط آزمون سمیت سلولی به اثبات رسید.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد نانوکامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن کوانتوم دات-آهن (PCL/Cs/CQD-Fe) به علت سمی نبودن، روند ترمیم زخم را بهبود می‌بخشد. نانوکامپوزیت زیست‌سازگار پلی‌کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن کوانتوم دات-آهن یک داربست مورد توجه در زمینه پوشش زخم می‌باشد که فرآیند بازسازی پوست را به شدت سرعت می‌بخشد.

واژگان کلیدی: کربن کوانتوم دات، ترمیم زخم، پلی‌کاپرولاکتون، نانوذرات مغناطیسی، سمیت، Iau Science

مقدمه

پوست یکی از وسیع‌ترین بافت‌های نرم می‌باشد و به‌طور متوسط ۱۵٪ از وزن کل بدن انسان را تشکیل می‌دهد. پوست نقش محافظ در برابر عوامل خارجی از جمله میکروب‌ها به داخل بدن را دارد و در حفظ رطوبت و تنظیم دمای بدن و اجزای سیستم ایمنی بدن نقش اصلی را ایفا می‌کند (۱ و ۲). آسیب‌های پوستی می‌تواند عملکرد حیاتی

نویسنده مسئول:

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
 ۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- پست الکترونیکی: Yazdian@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۶

است که با افزایش وزن مولکولی، بلورینگی آن کاهش می‌یابد. ویژگی‌هایی نظیر حلالیت خوب پلی‌کاپرولاکتون، نقطه ذوب پایین (۶۴-۵۹ درجه سلسیوس) و زیست-سازگاری بسیار عالی آن، سبب شده تحقیقات گسترده‌ای از کاربرد بالقوه‌ی آن در زمینه‌ی پزشکی به وجود آید (۱۴). یکی از معایب آن عدم وجود گروه‌های عاملی بر سطح زنجیره‌های پلیمری می‌باشد که آن را به پلیمری هیدروفوب تبدیل کرده است. با توجه به آب‌گریزی پلی‌کاپرولاکتون ایجاد یک توزیع یکنواخت از کشت سلولی روی نانوالیاف متخلخل تشکیل شده از این پلیمرها دشوار می‌باشد. همچنین آب‌دوستی نانوالیاف در چسبندگی سلول‌ها به سطح آن نیز مؤثر بوده که در ترمیم بافت آسیب‌دیده حائز اهمیت است. با وجود این مشخصات در مطالعات مختلف از ترکیب این پلیمر با ترکیبات مختلف در جهت تعدیل این مشخصه استفاده شده است. به منظور اصلاح ویژگی آب-گریزی داربست تهیه شده از پلی‌کاپرولاکتون با روش الکترورسی در این تحقیق از کیتوزان بهره برده شد (۱۵). داربست‌های مهندسی بافت، چارچوب‌های زیستی هستند که از رشد، تکثیر و تمایز سلول‌ها در بدن حمایت می‌کنند. در این میان، داربست‌های الکترورسی شده به شکل مناسبی از لحاظ مکانیکی و زیستی از زمینه خارج سلولی تقلید می‌کنند. این داربست‌ها نقش مؤثری در بازسازی و ترمیم بافت ایفا می‌کنند. از روش‌های تهیه داربست‌های الکترورسی، افزودن نانوذرات به زمینه پلیمری (نانوکامپوزیت) است (۱۶). در دهه اخیر، مشخص شده نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی $MNPs-Fe_3O_4$ ، واجد پتانسیل عملکرد ضد میکروبی بوده و می‌توانند برای درمان بیماری‌ها و ساخت تجهیزات پزشکی معرفی شوند. با این-حال، تعداد مطالعات گزارش شده در این حوزه بسیار اندک بوده است (۱۷). اثرات نانوذرات آهن و مشتقات آن، روی فرآیندهای مختلف باکتریایی مانند میزان رشد باکتری، مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج قابل قبولی مشاهده شد (۱۸). به تازگی تلاش‌های فراوان جهت توسعه نانوکامپوزیت‌های زیستی با هدف تولید داربست‌های مهندسی بافت و زخم‌بندی انجام گرفته است. در یک مطالعه، ویژگی آنتی‌باکتریایی Cu-CDS مشخص شد (۱۹). در تحقیق آزادمنش و همکاران، داربست هسته/پوسته ترمیم‌کننده زخم با استفاده از پلی‌لاکتیک اسید (PLA) ساخته شد. هسته داربست از اسید هیالورونیک (HA)، نقاط کربن کوانتوم دات-مس (Cu-CQDs)، رزماریک - اسید و هیدروژل کیتوزان تشکیل شد (۲۰). در پژوهش

آن را که محافظت از انسان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد، دچار اختلال کند (۳). زخم‌های پوستی و کاهش زمان بهبود آن‌ها، یکی از جنبه‌های مهم پزشکی محسوب می‌شوند (۴). دو مشکل اصلی در ترمیم آسیب‌های پوستی ترشحات و تجمع میکروارگانیسم‌ها در منطقه آسیب دیده است. از این رو، کنترل ترشحات و مبارزه با باکتری‌ها و میکروب‌ها برای ترمیم زخم ضروری است (۵،۶). به تازگی، نانو مواد کربنی به‌عنوان ترکیبات آنتی‌باکتریایی استفاده می‌شود. از بین این مواد، کربن‌دات‌ها (CDS) پتانسیل بالایی در کاربردهای زیست‌پزشکی شامل ترمیم-بافت، به علت ویژگی‌های بسیار خوب مانند نسبت بالای سطح به حجم، زیست‌سازگاری مناسب و مقرون‌به‌صرفه بودن دارند (۷،۸). با وجود پیشرفت‌های عمده در درمان زخم‌ها، کماکان تلاش در جهت یافتن روش‌های مؤثر در درمان زخم‌ها در کوتاه‌ترین زمان ممکن و با کمترین عارضه ادامه دارد. یکی از روش‌های مدرن برای درمان زخم‌ها استفاده از بیوپلیمرها (پلیمرهای طبیعی) است. بیوپلیمرها در مقایسه با پلیمرهای سنتزی واکنش‌های بهتری با سلول-ها و سیستم‌های بیولوژیکی دارند (۹). استفاده از بیوپلیمرهای مناسب به عنوان پوشش زخم می‌تواند بهبود زخم را نسبت به بانداژهای قدیمی بسیار تسریع بخشد. بانداژهای جدید می‌تواند حاوی ترکیبات زیست‌فعال مانند مواد ضد میکروبی، ضد باکتری و مواد ضد التهابی که به درون زخم منتشر شده و مانع عفونت زخم می‌شوند، باشند. اکثر بیومتریال‌هایی که در ترمیم زخم بکار می‌روند، از بیوپلیمرها مشتق می‌شوند. بیوپلیمرها از ترکیبات طبیعی غیرسمی تشکیل شده و به‌طور نهادی زیست‌سازگارند (۱۰). کیتوزان بیوپلیمر زیست‌سازگاری است که دارای ویژگی‌های زیست‌تخریب‌پذیری، آب‌دوستی، غیرآنتی - ژنیک، غیرسمی، بهبود دهنده زخم و دارای اثرات آنتی-باکتریال و ضدقارچ با منشأ طبیعی است که برای تسریع فرآیند درمان زخم ضروری هستند (۱۱). کیتوزان به‌عنوان یک جزء ماتریس خارج سلولی جهت تهیه داربست متخلخل در مهندسی بافت مورد بررسی قرار گرفته است (۱۲). ترکیب پلیمرها یکی از مهمترین روش‌های مؤثر جهت بدست آوردن ویژگی‌های جدید و بیوکامپوزیت‌های مطلوب برای کاربردهای خاص می‌باشد. برای مثال ترکیب پلیمرهای سنتزی و طبیعی می‌تواند باعث بهبود چسبندگی سلول‌ها و تخریب‌پذیری نانوفیبرها شود (۱۳). پلی‌کاپرولاکتون (PCL) یکی از پلیمرهای هیدروفوب خطی نیمه‌کریستالی

سنجش خواص مغناطیسی نانوذرات Fe و CQD-Fe منحنی هیستریزیس^۲ مربوطه، در محدوده میدان مغناطیسی ۱۰۰۰۰+ و ۱۰۰۰۰- بررسی شد. مورفولوژی سطحی نانوذرات (شکل، صافی، زبری و توده‌ای شدن) با استفاده از دستگاه SEM بررسی گردید.

تهیه و کشت سلول‌های فیبروبلاست L929

در این مطالعه نوع سلول مصرفی رده سلولی فیبروبلاست (ATCC-NCTC 929) L₉₂₉ در فلاسک‌های ۲۵ سانتی-مترمربعی از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران خریداری گردید. پس از ضدعفونی کردن اطراف فلاسک با اتانول ۷۰٪، محیط کشت اضافی آن زیر هود لامینار خارج شد و پس از بررسی زیر میکروسکوپ از نظر تراکم سلولی، به انکوباتور CO₂ با شرایط ۵٪ CO₂، ۹۰٪ هوای مرطوب و دمای ۳۷ درجه سلسیوس منتقل گردید. فلاسک‌ها روزانه به وسیله میکروسکوپ از نظر رشد و تراکم سلولی، مورفولوژی سلولی و کنترل عدم آلودگی باکتریایی و قارچی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعویض محیط کشت فلاسک‌ها زیر هود لامینار، محیط کشت کهنه خارج و محیط کشت استریل جدید به فلاسک‌ها اضافه شد. فلاسک‌ها مجدداً به انکوباتور منتقل شدند. رده سلولی L₉₂₉ در ۲ گروه تقسیم شدند (۱- کنترل مثبت، ۲- کربن کوانتوم دات-آهن با غلظت ۲-۰٪). برای هر گروه تست‌ها سه مرتبه تکرار شد.

تهیه داربست پلی‌کاپرولاکتون

داربست مورد استفاده در این تحقیق باروش الکتروریسندگی تهیه شد. برای این منظور از دستگاه CO881007NYI ساخت شرکت نانو ساختار آسیا کشور ایران استفاده شد. این دستگاه مجهز به یک جمع‌کننده دوار با ضخامت ۷۰ mm و پهنای ۵۰ mm می‌باشد. برای تهیه داربست هدف، محلول ۴۰٪ از PCL-SP که در سامانه حلال حاوی اسید فرمیک و اسیداستیک به صورت محلول درآمده، استفاده شد. نانوالیاف در بازه زمانی ۲ ساعت جمع آوری شدند که سرعت جمع آوری نمونه‌ها ۸/۸ ثانیه بر میلی‌متر بود و با چرخش ۲۵۰rpm نمونه‌های نانوالیاف جمع‌آوری شد. فاصله سوزن تزریق تا داربست ۲۰ Cm بود و در ولتاژ ۲۰ kV این فرآیند انجام شد. برای بهبود ویژگیهای آب‌دوستی سطح داربست، از پوشش‌دهی با کیتوزان (۷۵-۸۵٪ دآسیله- وزن مولکولی متوسط) استفاده شد. در این پژوهش ساخت نانوالیاف زیست-تخریب‌پذیر ترکیبی کیتوزان/پلی‌کاپرولاکتون (۲۱٪ کیتوزان و ۸٪ پلی‌کاپرولاکتون) با ترکیب

نعمتی و همکاران، ساخت نانوالیاف برپایه PVA حاوی سلولز اصلاح شده با نیتروکربن گرافیتی/گزنه/زنیان به روش الکتروریسی به‌عنوان زخم‌پوش بررسی گردید (۲۱). Sun و همکاران، با الهام از پروتئین‌های چسب صدفی، یک هیدروژل مبتنی بر کیتوزان اصلاح شده با اسیدگالیک با فناوری تخلیه پلاسما تهیه کردند (۲۲). در تحقیق حاضر، هدف توسعه یک داربست نانوکامپوزیت متشکل از پلی-کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن کوانتوم دات-آهن (Cs/CQD) (Fe/PCL) می‌باشد. تازگی این مطالعه، تهیه یک پانسمان زخم مدرن مبتنی بر پلی‌کاپرولاکتون با روش الکتروریسندگی است. اثر سمیت و زیست‌سازگاری این داربست با استفاده از MTT مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به روش تجربی و در آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد واحد تهران شمال و دانشکده علوم و فنون دانشگاه تهران در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ اجرا شد. همه مواد شیمیایی و حلال‌های آلی از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شدند. جهت تعیین مورفولوژی نانوکامپوزیت و اندازه‌گیری متوسط سایز ذرات از دستگاه‌های FT-IR مدل ۱۰۰۳،۰۶، شرکت Perkin Elmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل KYKY_EM۳۲۰۰، اسپکتروفوتومتر مدل PG Instrument، دستگاه انکوباتور مدل Binder و شیکرانکوباتور مدل IKA و دستگاه سانتریفیوژ مدل Sigma استفاده شد. آزمون XRD با استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس مدل PW 1730، تحت تابش Cu-K α ($\lambda=1.5406$ Å)، در ولتاژ ۴۰ کیلوولت و جریان ۳۰ میلی‌آمپر انجام گرفت. محدوده اسکن 2 θ از ۸۰-۱۰ درجه قرار داده شد. جهت بررسی پیوندهای تشکیل شده، شناسایی گروه‌های عاملی و ساختار مولکولی نمونه‌ها با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) ارزیابی گردید. ابتدا نمونه‌ها با پتاسیم برمید (KBr) خالص مخلوط و به صورت قرص نازک شکل‌دهی شدند. سپس توسط دستگاه FTIR (TENSOR27-BRUKER- 6300) پیک جذب در طول موج‌های در محدوده cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰۰ مشاهده و نوع پیوندها با بررسی طول موج قله‌ها مشخص گردید. مغناطش اشباع (MS) نمونه‌ها با دستگاه مغناطیس سنج نمونه مرتعش (VSM) (MDK; Meghnatis Daghigh) (Kavir Co.; Iran) در دمای اتاق اندازه‌گیری شد. جهت



ارزیابی سمیت سلولی نانوذرات

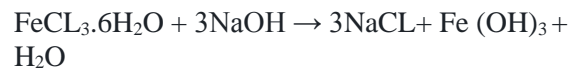
ارزیابی سمیت سلولی یک روش مهم در خصوص زنده ماندن سلول است تا بتوان استفاده بالقوه از فیلم ساخته شده را در ترمیم زخم تایید کرد. جهت بررسی اثر سمیت سلولی، روش رنگ‌سنجی MTT^۳ (۵،۴- دی متیل تیا زول -۱۲ ایل)- در ۵،۲- دی فنیل تترازیلیوم بروماید انجام شد. این یک تست رقابتی متابولیکی میتوکندری است که عملکرد آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی در تجزیه تترازیلیوم توسط سلولهای زنده را نشان می‌دهد. در این روش، بر خلاف سایر روش‌ها، مراحل شستشو و جمع‌آوری سلول که اغلب باعث از دست رفتن تعدادی از سلول‌ها و افزایش خطای کار می‌شوند، حذف شده‌اند و تمام مراحل آزمایش از ابتدای کشت سلولی تا قرائت نتایج با ایزا ریدر، در یک میکروپلیت انجام می‌شود لذا تکرارپذیری، دقت و حساسیت آزمایش بالاست. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌های زنده، رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و باید قبل از رنگ‌سنجی توسط حلالی نظیر دی‌متیل سولفوکسید به حالت محلول درآیند. در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۰۰ نانومتر به وسیله ELISA Reader اندازه‌گیری می‌گردد (۲۳). ابتدا سوسپانسیونی از سلول نرمال تهیه شد. تست MTT برای سنجش میزان سمیت کربن کوانتوم دات-آهن/ کیتوزان و کربن کوانتوم دات-آهن/ کیتوزان/ پلی‌کاپرولاکتون در غلظت ۲٪ آزمون سمیت سلولی انجام شد. فیبروبلاست‌های موشیپ L۹۲۹ در غلظت ۱۰^۶ سلول مدت ۲۴ ساعت در یک پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. سپس محیط کشت هر چاهک با ۱۰۰ میکرولیتر FBS و DMEM عوض شد. ۲۰ میکرولیتر محلول حاوی نانوذره با غلظت مشخص به هر چاهک اضافه و به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۲۰ میکرولیتر MTT (۵۵ mg/ml in PBS) جایگزین محیط قبلی شد و مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. در نهایت محیط کشت حاوی MTT با ۱۵۰ میکرولیتر در نهایت، محیط حاوی MTT خارج و ۱۵۰ میکرولیتر DMSO افزوده شد و ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. میزان جذب توسط دستگاه ایزا در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت گردید. آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. میزان جذب به طور مستقیم با تعداد سلول‌های زنده متناسب است. نتایج بر حسب درصد سلول-های زنده نسبت به کنترل از رابطه زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{(OD) \text{ سلول‌های تیمار شده}}{OD \text{ سلول‌های کنترل}} = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

اختلاط ۵۰:۵۰ (۱:۱) با فلئوئوریک اسید استیک (TFA) به عنوان حلال صورت گرفت (۱۵).

تهیه نانوذرات کربن کوانتوم دات-آهن

نانوذرات مغناطیسی کربن کوانتوم دات-آهن با استفاده از روش هیدروترمال طبق واکنش زیر سنتز گردید:



ابتدا ۲ گرم دی‌آمونیم هیدروژن سترات به عنوان منبع کربن با آب مقطر به حجم ۷۵ میلی‌لیتر رسانده شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به صورت کامل حل شد، سپس ۱ گرم FeCl₃.H₂O به عنوان منبع فلزی اضافه گردید و با همزدن به طور کامل حل شد، ۰/۴۵ گرم سدیم هیدروکسید به عنوان پایدارکننده به محلول فوق افزوده تا محلول همگن به دست آید، این محلول درون بمب هیدروترمال ریخته شد و ۲۴ ساعت درون آون ۱۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا کربن کوانتوم دات-آهن با غلظت نهایی ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تشکیل شود. نمونه سانتریفیوژ شد و در یخچال ۲۰- درجه سلسیوس کاملاً فریز سپس فریز درای گردید.

تهیه نانو کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون / کیتوزان / کربن کوانتوم دات-آهن

جهت سنتز نانو کامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/ کیتوزان/ کربن-کوانتوم دات-آهن ابتدا محلول کیتوزان ۳٪ وزنی/ حجمی در اسید استیک ۲٪ آماده شد، به این ترتیب که کیتوزان آرام آرام روی استیرر اضافه شد تا در اسید استیک کاملاً حل شود، سپس به سه نمونه تقسیم شد و سه غلظت مختلف (۵، ۱، ۲ درصد حجمی/حجمی) کربن کوانتوم دات-آهن به آن‌ها اضافه شد، در نهایت ۳۰۰ میکرولیتر گلی‌اوکسال به عنوان کراس لینک اضافه شد و اجازه داده شد روی استیرر کاملاً مخلوط گردد. سه داربست پلی-کاپرولاکتون داخل سرنگ قرار داده شد و مخلوط بالا به آن اضافه گردید و در دمای ۴۸ درجه سلسیوس مدت ۲۰ دقیقه سرنگ‌ها داخل آب رها شدند تا کراس لینک بین ژل و داربست صورت گیرد. سپس سرنگ‌ها در ۳۲۰۰ دور در دقیقه مدت ۳۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محتویات برای انجام آنالیزهای بعد داخل یخچال قرار داده شد.

مشخصه‌یابی داربست PCL/Cs/CQD-Fe

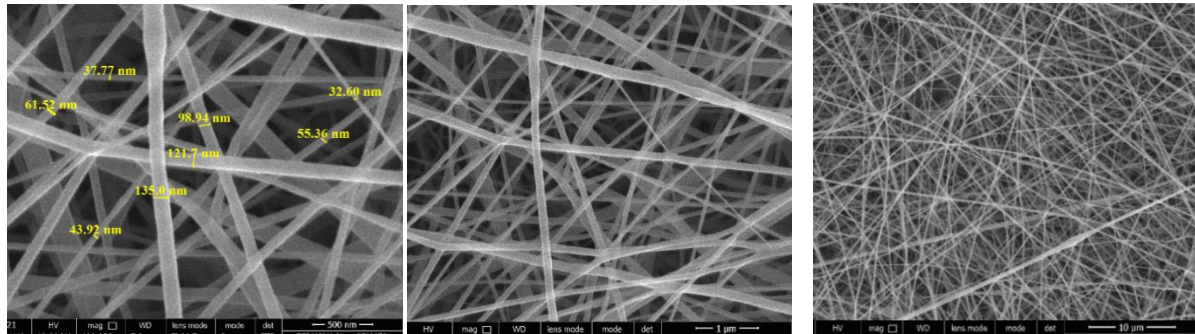
بعد از سنتز نانو کامپوزیت، با استفاده از روش‌های تحلیلی مختلف، مشخصه‌یابی انجام شد.

یافته‌ها

به تصاویر، نانوذرات دارای ساختار متراکم جامد هستند و سطح نانوذرات همگن به نظر می‌رسد که نشان‌دهنده سازگاری خوب بین پلی‌کاپرولاکتون، کیتوزان و کربن-کوانتوم دات-آهن است.

مورفولوژی نانوذرات پلی‌کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن‌کوانتوم دات-آهن

شکل ۱ تصاویر SEM نانوذرات پلی‌کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن‌کوانتوم دات-آهن را نشان می‌دهد. قطر متوسط نانوذرات در محدوده ۳۲/۶-۱۳۵/۰ nm به دست آمد. با توجه



(الف)

(ب)

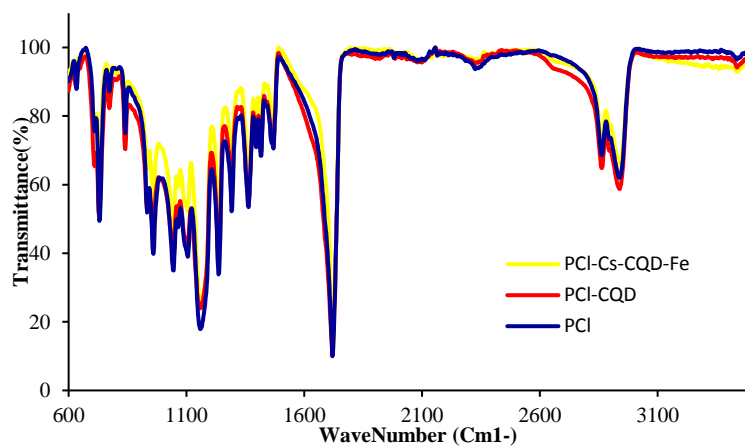
(ج)

شکل ۱ - تصاویر SEM نانوکامپوزیت PCL/Cs/CQD-Fe با بزرگنمایی (الف) ۵۰۰ nm، (ب) ۱ μm، (ج) ۱۰۰ μm

و N-H موجود در آلکن و آمین می‌باشد. نتایج FTIR تشکیل پیوند نانوذرات کربن دات و آهن را نشان می‌دهد. برای نانوذرات پلی‌کاپرولاکتون پیک ناحیه $2924/42 \text{ cm}^{-1}$ کشش متقارن CH_2 ، در ناحیه $1921/69 \text{ cm}^{-1}$ ارتعاش کششی گروه کربونیل (C=O)، در ناحیه 1255 cm^{-1} ارتعاش کششی متقارن C-O-C است. طیف FTIR حاصله، تشکیل یک پوسته پلی‌کاپرولاکتون روی نانوذرات مغناطیسی کربن کوانتوم دات-آهن و کیتوزان را تأیید کرد. شکل ۲ به وضوح نشان می‌دهد تأثیر اصلاح کننده‌ها بر ساختار بلوری نمونه پلی‌کاپرولاکتون ناچیز است، به بیان دیگر ساختار پلی‌کاپرولاکتون پس از عامل دار شدن با کربن کوانتوم دات-آهن و کیتوزان دستخوش تغییر چندانی نشده است.

طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)

طیف FTIR نانوکامپوزیت پلی‌کاپرولاکتون/کیتوزان/کربن کوانتوم دات-آهن، پلی‌کاپرولاکتون/کربن کوانتوم دات-آهن و پلی‌کاپرولاکتون در شکل ۲ نشان داده شده است. در این طیف، پیک در محدوده 3439 cm^{-1} به ارتعاشات کششی پیوند O-H اشاره دارد. پیک در ناحیه 2099 cm^{-1} می‌تواند مربوط به پیوند کششی N=C باشد، همچنین نوار جذبی در محدوده 1639 cm^{-1} به حالت ارتعاشات کششی گروه‌های $\text{C}=\text{N}$ و $\text{C}=\text{O}$ ، NH_2 ، NH ، $\text{C}=\text{C}$ و امید نسبت داده می‌شوند. پیک در ناحیه 1395 cm^{-1} به پیوند $\text{C}=\text{O}$ کریوکسیلیک اسید اشاره دارد. پیک نسبتاً پهن موجود در محدوده 730 cm^{-1} مربوط به گروه‌های C-H

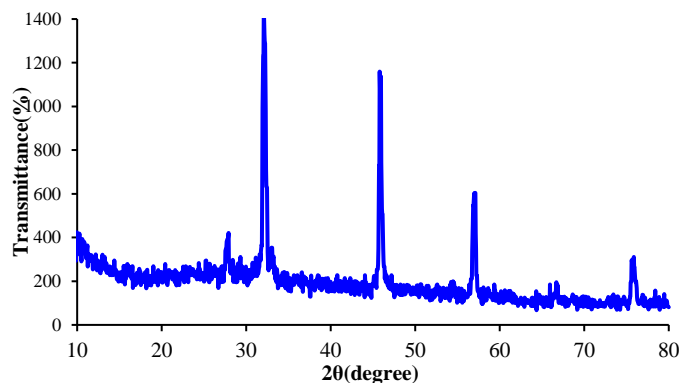


شکل ۲- طیف FTIR نانوذرات PCL/Cs/CQD-Fe، PCL/CQD-Fe و PCL

XRD

می‌دهد. قله‌های قوی موجود $2\theta = 32/2^\circ$ ، $56/8^\circ$ و $66/8^\circ$ وجود نانوذرات مغناطیسی را نشان می‌دهند. پیک در ناحیه $2\theta = 20/5^\circ$ نشان‌دهنده CQD در ساختار نانوکامپوزیت است.

شکل ۳، الگوی تفرق اشعه ایکس نانوکامپوزیت PCL/Cs/CQD-Fe را نشان می‌دهد. الگوی XRD نانوذرات در موقعیت $2\theta = 23/3^\circ$ و $2\theta = 27/8^\circ$ PCL را نشان

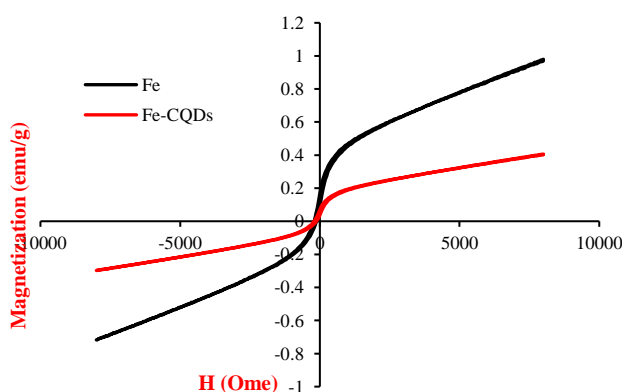


شکل ۳- طیف XRD نانوذرات PCL/Cs/CQD-Fe

مغناطیس سنج ارتعاشی (VSM)

مغناطش پسماند^۳ و وادارندگی^۴ مغناطیسی ناچیز در نتایج حاصله بیانگر سوپرپارامغناطیس بودن نانوذرات مغناطیسی در CQD-Fe است. نتایج تحقیق حاضر همراستا با نتایج انصاری بود که اشباع مغناطیسی نانوذرات سنتز شده به روش همرسوبی، در دمای محیط 10 emu/g به دست آمد (۲۴).

مطابق شکل ۴، مغناطش اشباع (Ms) نانوذرات Fe در دمای اتاق، 0.98 emu/g حاصل شد که این مقدار برای نانوذرات CQD-Fe با کاهش قابل توجهی، 0.38 emu/g به دست آمد. کاهش مغناطش اشباع در نانوذرات CQD-Fe به علت محصورشدن نانوذرات Fe توسط CQD- می‌باشد.



شکل ۴- نتایج آزمون VSM برای نانوذرات

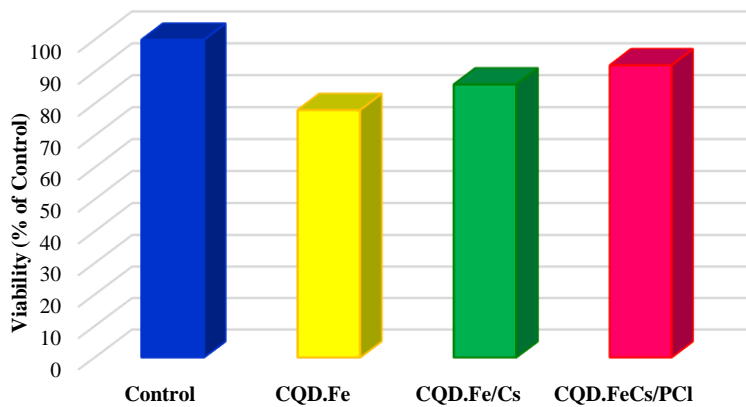
^۴ Coercivity

^۳ Remanent magnetization

ارزیابی سمیت سلولی نانوذرات

رزماریک اسید بررسی گردید. نتایج نشان داد با غلظت مس در حدود ۲٪ بیشترین مهار مشاهده شد و بیشترین میزان زنده ماندن (بیش از ۹۵٪) با غلظت ۲۵٪ به دست آمد (۱۹).

آزمون MTT برای سنجش میزان سمیت نانوذرات کربن کوانتوم‌دات-آهن، کربن کوانتوم‌دات-آهن/کیتوزان و کربن کوانتوم‌دات-آهن/کیتوزان/پلی‌کاپرولاکتون در غلظت ۲٪ این نانوذرات انجام شد. بیشترین میزان زنده ماندن سلول فیبروبلاست L929 (بیش از ۹۵٪) مربوط به نانوکامپوزیت کربن کوانتوم‌دات-آهن/کیتوزان/پلی‌کاپرولاکتون می‌باشد (شکل ۵)، که نتیجه‌ای قابل قبول است و عدم سمیت نانوکامپوزیت موردنظر به اثبات می‌رسد. در تحقیق آزادمنش و همکاران اثر سمیت نانوکامپوزیت کربن کوانتوم‌دات-مس/پلی‌لاکتیک‌اسید/هیالورونیک‌اسید/کیتوزان/



شکل ۵- مقایسه زنده مانی سلول گروه کنترل و نانوذرات کربن کوانتوم‌دات-آهن، کربن کوانتوم‌دات-آهن/کیتوزان و کربن کوانتوم‌دات-آهن/کیتوزان/پلی‌کاپرولاکتون

نانومواد و دیواره‌های باکتری‌ها، آبگریزی نانوذرات نیز نقش مهمی در نفوذ آنها به باکتری‌ها دارد. بعلاوه، دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی از تعداد زیادی لیپید تشکیل شده است و اگر نانوذره دارای یک سطح آب دوست باشد، می‌تواند چسبندگی نانوذره به باکتری را افزایش دهد. براساس این گزارش (۲۷)، نانوذرات در ابعاد کوچک متشکل از مواد آب دوست ممکن است خواص آبگریزی خوبی از خود نشان دهند، اما با افزایش اندازه آنها دوباره آبگریزی می‌شوند. از آنجا که نقاط کربن اندازه کمی دارند (۱۰-۲۰nm)، می‌توان انتظار داشت این امر برای بهبود اتصال به دیواره سلولی باکتری‌ها، نفوذ به غشا، و از بین بردن باکتری‌ها تأثیر مثبتی داشته باشد. همچنین، داربست‌های پلیمری بستر بسیار مناسبی جهت قرارگیری سلول‌ها و عوامل پروتئینی دخیل

بحث

پوست یک ارگان محافظ طبیعی مهم است که اندام‌های داخلی را از آسیب خارجی محافظت و از دست دادن آب بدن جلوگیری می‌کند (۲۵). آسیب‌های خارجی مانند سوزش یا آسیب دیدگی باعث می‌شود پوست مکانیسم دفاعی خود را از دست دهد. در این حالت، میکروارگانیسم‌ها به راحتی حمله و شروع به تشکیل کلتی می‌کنند، در نتیجه عفونت‌های شدید زخم ایجاد می‌شود که می‌تواند روند بهبودی را مهار کند و حتی باعث ایجاد عوارض تهدید کننده زندگی شود. بنابراین، ایجاد یک درمان سریع و موثر پوست یکی از اولویت‌های علوم پزشکی مدرن است. سطح اکسیژن، pH، آنزیم‌ها و مواد مغذی از عوامل مهم تأثیرگذار بر روند ترمیم زخم هستند (۲۶). علاوه بر تأثیر بر تعامل بین

الکتروروسی دور بالا تهیه شد. مطالعات دیگر نشان می‌دهند، نانو داربست‌های ساخته شده با این روش دارای منافذ ریز بوده که سلول‌ها قادر به نفوذ به این منافذ نیستند، از طرفی این نانوفیبرها باعث افزایش نسبت سطح به حجم و رسیدن بهتر فاکتورهای رشد به سلول‌ها می‌شوند (۳۳-۳۵). طبق نتایج، میانگین اندازه ذرات نانوفیبر پلی-کاپرولاکتون / کیتوزان / کربن کوانتوم دات-آهن در محدوده ۱۳۵/۰-۳۲/۶ نانومتر گزارش شد.

نتایج SEM داربست پلی کاپرولاکتون / کیتوزان / کربن کوانتوم دات-آهن نشان‌دهنده ادغام موفق پلیمر پلی کاپرولاکتون با کیتوزان و کوانتوم دات-آهن و تولید فیبرهای یکنواخت بود. طبق نتایج XRD استنباط می‌شود نانوذرات موردنظر با موفقیت تشکیل شده‌اند. نتایج FTIR تشکیل پیوند نانوذرات کربن کوانتوم دات و آهن را نشان داد. طبق نتایج مغناطیس سنج ارتعاشی (VSM)، مغناطش پسماند ناچیز در نتایج حاصله بیانگر سوپرپارا مغناطیس بودن نانوذرات مغناطیسی کربن کوانتوم دات-آهن می‌باشد. در تست MTT بیشترین میزان زنده مانی (بیش از ۹۵٪) باغلظت ۲٪ نانوکامپوزیت کربن کوانتوم دات-آهن / کیتوزان / پلی-کاپرولاکتون بود.

نتیجه گیری

در این مطالعه داربست زیستی نوین از ترکیب پلی-کاپرولاکتون / کیتوزان / کربن کوانتوم دات-آهن با استفاده از روش الکتروروسی تولید شد و ویژگی‌های آزمایشگاهی آن مورد مطالعه قرار گرفت. خواص فیزیکی و شیمیایی نانوذرات با استفاده از SEM، FTIR و XRD ارزیابی شد. دستورالعمل MTT روی سلول‌های فیبروبلاست، سمی نبودن نانوذرات را نشان داد. نانوکامپوزیت زیست سازگار پلی کاپرولاکتون / کیتوزان / کربن کوانتوم دات-آهن یک داربست مورد توجه در زمینه پوشش زخم می‌باشد که

در امر ترمیم بافتی را فراهم می‌آورند. یکی از الزامات بازسازی موفق بافت ها و عملکرد بهتر سلول های ترمیمی در محل زخم استفاده از داربست سلولی مناسب وسازگار با بافت موردنظر است (۲۸). پلی کاپرولاکتون داربست زیست-تخریب پذیر و زیست سازگاری است که اثر سمی برای سلول در آن گزارش نشده و با ساختار نانوفیبری خود امکان همانندسازی ماتریکس خارج سلولی را برای رشد بهتر سلول های بنیادی محل زخم فراهم می‌سازد (۲۹). نکته مهم در مورد استفاده از داربست های سلولی، عدم حساسیت سلول ها به جنس این داربست ها و عدم سمیت برای سلولها است. در بین انواع داربست های سلولی مصنوعی، داربست های نانوفیبر پلی کاپرولاکتون به عنوان فرآورده دارویی معرفی شده اند و به دلیل دارا بودن خواصی چون غیرسمی بودن، زیست تخریب پذیر بودن، زیست سازگاری و قطر فیبرهای مناسب برای کشت سلول ها بسیار مورد توجه می-باشند (۳۰، ۳۱). یکی از عوامل موثر در برطرف ساختن چالش های کشت خارج بافت سلول ها، بهینه کردن ساختار و جنس داربست ها جهت تکثیر و تمایز سلول های بنیادی در هر بافت است. در همین راستا استفاده از داربست های دارای جنس و ساختار مناسب و فاقد اثرات سمی برای سلول ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است، در واقع هرچه داربست ساخته شده تشابه بیشتر به ماتریکس خارج سلولی داشته باشد، رشد بهتر سلول ها دست یافتنی تر است. Yoshimoto در مطالعه ای مدعی شد از بین انواع داربست های سلولی مصنوعی، داربست های نانوفیبر پلی کاپرولاکتون را می توان به عنوان یک فرآورده برای سلول ها در نظر گرفت و غیرسمی بودن، زیست سازگاری و قطر فیبرهای مناسب را سه دلیل اصلی سازگاری بالای سلول های بدن با این داربست دانست (۳۱). طبق گزارش Dash و همکاران یکی از دلایل برتری داربست های پلی کاپرولاکتون نسبت به پلیمرهای سنتزی دیگر تشکیل میزان مویرگ های بیشتری روی داربست های پلی کاپرولاکتون نسبت به مواد دیگر می-باشد (۳۲). نانوداربست مورد استفاده این مطالعه به روش فرآیند بازسازی پوست را به شدت سرعت می بخشد.

منابع

1. Talikowska M, Fu X, Lisak G. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. *Biosensor Bioelectronic*, 2019; 135: 50-63.
2. Tarassoli SP, Jessop ZM, Al-Sabah A, Gao N, Whitaker S, Doak S, Whitaker IS. Skin tissue engineering using 3D bio printing: an evolving research field. *J Plastic, Reconstructive Aesthetic Surgery*. 2018; 71: 615-623.
3. Khateri Roodbordeh M, Hassanzadeh Nemati N. Synthesis and evaluation of Nano hydrogel film containing polyvinyl alcohol/hyaluronic acid/zinc oxide for wound dressing. *Dermatolog Cosmet*, 2020; 11(4): 256-267.
4. Affary F, Nilforoushzadeh MA, Sharifian H, Mollabashi Z. Wound healing in animal models: review article. *Tehran Uni Med J*, 2017;75(7) :471-9.
5. Kamoun EA, Kenawy E.-RS, Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J adv res*, 2017; 8(3): 217-233.
6. Moeini A, Pedram P, Makvandi P, Malinconico M, Gomez d' Ayala G. Wound healing and antimicrobial effect of active secondary metabolites in chitosan-based wound dressings: A review. *Carbohydr Poly*, 2020; 233: 115839.
7. Georgakilas V, Perman J, Tucek J, Zboril R. Classification, chemistry, and applications of fullerenes, carbon dots, nanotubes, graphene, nanodiamonds, and combined superstructures. *Chem Rev*, 2015; 115:4822.
8. Yu J, Zhao Z, Sun J, Geng C, Bu Q, Wu D, et al. Electrospinning Highly Concentrated Sodium Alginate Nanofibres without Surfactants by Adding Fluorescent Carbon Dots. *Nanomater*, 2020; 10 (3): 565.
9. Torres-Giner S, Wilkanowicz S, Meléndez-Rodríguez B, Lagaron JM. Nano encapsulation of Aloe Vera in Synthetic and Naturally Occurring Polymer by Electro Hydrodynamic Processing Interest in Food Technol and Bioactive Packaging. *J Agricultural Food Chem*, 2017; 65(22): 4439-4448.
10. Samadian S, Karbalaei A, Pourmadadi M, Yazdian F, Rashedi H, Omidi M, Malmir S. A novel alginate-gelatin microcapsule to enhance bone differentiation of mesenchymal stem cells. *Inter J Poly Mater Poly Bio Mater*, 2022; 71(6): 395-402.
11. Rocha MAM, Coimbra MA, Nunes C. Applications of chitosan and their derivatives in beverages: a critical review. *Current Opinion Food Sci*, 2017;15(2017): 61-69.
12. Ghomi H, Sepyani A, Mirhaj M. Fabrication and evaluation of (chitosan/poly-vinyl-pyrrolidone) scaffold properties containing gum tragacanth by freeze-drying method. *New Proc Mat Eng*, 2020; 14(1): 27-43.
13. Ciardelli G, Chiono V, Vozzi G, Pracella M, Ahluwalia A, Barbani N, et al. Blends of poly-(epsilon-caprolactone) and polysaccharides in tissue engineering applications. *Bio macromol*, 2005; 6(4):1961-1976. DOI: 10.1021/bm0500805.
14. Zhou Y, Y Dong, G Huang, Y Wang, X Hangmen al. Lysosome-oriented, dual-stage pH-responsive polymeric micelles for β -Lapachone delivery. *J Mater Chem B*, 2016; 14; 4(46): 7429-7440. doi: 10.1039/C6TB02049F.
15. Khademi S, Shokrollahi P, Zandi M, Irani Sh. Gelatin-chitosan coating enhances L929 fibroblasts proliferation on supramolecular nano-fibrous scaffolds. *Molecul Cellular Res*, 2016; 28 (4): 500-512.
16. Engineering SS, Shafiei M, Shavandi Y, Nickakhtar. Effect of Nano clay Addition on the Properties of Poly caprolactone Nanocomposite Scaffolds Containing Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells used in Soft Tissue. *J Adv Mater Eng*, 2021; 39 (4): 45-59.
17. Prabhu YT, Rao KV, Kumari BS, Sai Kumar VS, Pavani T. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and its antibacterial application. *Int Nano Lett*, 2015; 5(2): 85- 92.
18. Alamdar N, Rasekh B, Yazdian F. Effects of Fe/SDS and Au nanoparticles on *P. aeruginosa* bacterial growth and bio-surfactant production. *IET Nano biotech*, 2018; 12(4): 520-525.

19. Wang K, Xu J, Li H, Wang X, Wu Y, Zhang D, et al. Transition metal-carbon quantum dots composites and their antibacterial properties. *J Biomat Tissue Eng*. 2018; 8(3): 309-316.
20. Azadmanesh F, Zavar Reza J, Yazdian F, Omidi M, Haghirosadat BF. Synthesis of a Novel Nanocomposite Containing Chitosan as a 3D Printed Wound Dressing Technique: Emphasis on Gene Expression. *Biotech Progres*, 2021; 37(2): e3132.
21. Nemati D, Ashjari M, Rashedi H, Yazdian F, Navaei-Nigjeh M. PVA based nanofiber containing cellulose modified with graphitic carbon nitride/nettles/trachyspermum accelerates wound healing. *Biotech Progres*, 2021; e3200.
22. Sun Ch, Zeng X, Zheng Sh, Wang Y, Li Zh, Zhang H, Nie L, Zhang Y, Zhao Y, Yang X. Bio-adhesive catechol-modified chitosan wound healing hydrogel dressings through glow discharge plasma technique. *Chem Eng J*, 2022; 427: 130843.
23. Ansari F. Use of magnetic nanoparticles to enhance bio desulfurization. *Mat Sci*, 2008.
24. Huang X, Zhang Y, Zhang X, Xu L, Chen X, Wei S. Influence of radiation cross linked carboxy methyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing. *Mater Sci Eng: C*, 2013; 33(8): 4816-4824.
25. Guo Sa, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J dental res*, 2010; 89(3): 219-229.
26. Shemetov AA, Nabiev I, Sukhanova A. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. *ACS nano*, 2012; 6: 4585-4602.
27. Waghmare VS, Wadke PR, Dyawanapelly S, Deshpande A, Jain R, Dandekar P. Starch based nanofibrous scaffolds for wound healing applications. *Bioact Mater*, 2018; 3: 255-266.
28. Dwivedi Ch, Pandey I, Pandey H, Patil S, Mishra Sh B, Pandey AC, et al. In vivo diabetic wound healing with nano fibrous scaffolds modified with gentamicin and recombinant human epidermal growth factor. *J Biomed Mater Res*, 2017; 106: 641-651.
29. Brodbeck WG, Patel J, Voskerician G, Christenson E, Shive MS, Nakayama Y, et al. Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 10287-10292.
30. Yoshimoto H, Shin YM, Terai H, Vacanti JP. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomater*, 2003; 24: 2077-2082.
31. Dash BC, Xu Z, Lin L, Koo A, Ndon S, Berthiaume F, et al. Stem cells and engineered scaffolds for regenerative wound healing. *Bioeng*, 2018; 5: 23.
32. He W, Ma Z, Yong T, Teo WE, Ramakrishna S. Fabrication of collagen-coated biodegradable polymer nanofibers mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomater*, 2005; 26(36): 7606-15.
33. Townsend-Nicholson A, Jayasinghe SN. Cell electrospinning: a unique biotechnique for encapsulating living organisms for generating active biological micro threads/scaffolds. *Bio macromol*, 2006; 7(12): 3364-3369.
34. Boland ED, Telemco TA, Simpson DG, Wnek GE, Bowlin GL. Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly (glycolic acid) for tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2004; 71(1): 144 -152.
35. Ian FR. Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. Wiley-Sons, 2