



Investigation of human cellular response on cyclic RGD peptide immobilized on silicon surfaces via click chemistry

Fahimeh Shamsi

Department of Biotechnology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran and School of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Sydney, NSW 2006, Australia

Abstract

Aim and Background: This study investigates the biological properties of cyclic RGD peptides being covalently immobilized via click chemistry onto alkyne terminated silicon surfaces.

Material and methods: At first cyclic RGD peptides were reacted with 4-azidophenyl isothiocyanate via a specific reaction. The azidated peptide was then covalently immobilized on an alkyne-terminated monolayer on silicon surfaces via the Cu (I)-catalyzed 1, 3-dipolar cycloaddition reaction. The surface structures of the attached peptide and control surfaces were characterized using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy. Then after seeding human fibroblast cells on the peptide and control substrates, Scanning electron microscopy (SEM) and Laser scanning confocal microscopy (LSCM) was used to examine the morphology of human fibroblast cells. Adhesion and proliferation of human fibroblast cells on control and modified surfaces were analyzed by cell adhesion and (MTS) assay .

Results: XPS and ATR-FTIR analysis showed the cyclic RGD peptides were successfully immobilized on silicon surfaces. Scanning electron microscopy (SEM) and Laser scanning confocal microscopy (LSCM) demonstrated that human fibroblast cells homogeneously distributed across the peptide-modified substrates and had a uniform appearance. Peptide-modified surfaces exhibited substantially superior cellular responses compared to those on control surfaces.

Conclusion: The research may suggest a procedure for the fabrication of biologically active surfaces in biosensor platforms.

Keywords: Cyclic RGD peptide, silicon, covalent immobilization, click chemistry, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Biotechnology, Faculty of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran and School of Chemical and Biomolecular Engineering, University of Sydney, NSW 2006, Australia
Email: fahimeh.shamsi@ymail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی اثر پاسخ سلولی انسانی بر روی پپتید حلقوی RGD تثبیت شده به طور کوالانسی بر روی سطح سیلیکون به روش کلیک شیمی

فهمیه شمسی

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران
دانشکده شیمی و مهندسی بیومولکولی، دانشگاه سیدنی، استرالیا

چکیده

سابقه و هدف: این مطالعه بررسی خواص بیولوژیکی پپتید حلقوی حاوی توالی RGD که از طریق شیمی کلیک بر روی سطح سیلیکون به طور کوالانسی تثبیت گردیده است بررسی می‌نماید.

مواد و روش‌ها: در این مقاله ابتدا پپتید حلقوی به طور اختصاصی به ۴- آزیدو فنل ایزوتیوسیانات از طریق یک واکنش اختصاصی متصل می‌گردد و سپس واکنش حلقه‌زایی ۳۱-دوقطبی آلکین و آزیدو پپتید با کاتالیزگر مس منجر به تثبیت کوالانت پپتید بر روی سطح سیلیکون می‌گردد. ساختارهای سطح پپتید و سطح کنترل به وسیله X-ray فتوالکترون اسپکتروسکوپی و اینفرارد اسپکتروسکوپی ATR-FTIR بررسی گردید. بعد از کشت سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطوح پپتید و کنترل، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ روبشی هم کانون لیزری (LSCM) جهت بررسی مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطح پپتید و کنترل استفاده گردید. چسبندگی و تکثیر سلول‌ها بر روی سطوح پپتید و کنترل به وسیله آزمون چسبندگی و (MTS) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: آزمایش‌های XPS و ATR-FTIR وجود پپتید را بر روی سطح سیلیکون به طور موفقیت‌آمیزی تأیید نمودند. میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) و میکروسکوپ روبشی هم کانون لیزری (LSCM) نشان دادند که سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی سطح پپتید حلقوی کشیده و تخت هستند به مقدار زیاد و به صورت زنده و یکنواختی بر روی سطح پپتید توزیع گردیده‌اند. نتایج آزمون چسبندگی سلولی و (MTS) نشان داد که پاسخ سلولی سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطوح عامل‌دار شده با پپتید به طرز چشم‌گیری بیش‌تر از سطوح کنترل است.

نتیجه‌گیری: این تحقیق یک روش ساده جهت تولید سطوح بیولوژیکی فعال برای تهیه بستر بیوسنسورهای بیولوژیک جهت تشخیص بیماری‌ها پیشنهاد می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: پپتید RGD حلقوی، سیلیکون، تثبیت کوالانسی، شیمی کلیک، Iau Science.

مقدمه

تثبیت موقت یا دائمی یک بیومولکول روی سطوح تثبیت سازی نامیده می‌شود. تثبیت فیزیکی آسان‌ترین راه برای تثبیت پپتید و پروتئین روی سطوح است اما این روش معایبی مثل جهت‌گیری تصادفی و اتصالات غیر اختصاصی ماده بیولوژیکی روی سطوح می‌گردد. هم‌چنین غلظت کافی از ماده بیولوژیکی بر روی سطح ایجاد نمی‌شود. اما تثبیت پایدار بیومولکول‌ها روی سطح جامد کاربرد زیادی در بیوسنسورهای تشخیصی، بیوچیپ و مهندسی بافت دارد

نویسنده مسئول:

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

پست الکترونیکی: fahimeh.shamsi@ymail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷

زایی و ۳-دوقطبی آلکین و آزید با کاتالیزگر مس، جهت تهیه ترکیب‌های حلقوی تری آزول است (۱۲، ۱۱). این روش برای اولین بار در سال ۲۰۰۱ توسط Sharpless معرفی شد (۱۳). شیمی کلیک به علت کارایی، تطبیق پذیری و انتخاب پذیری بالای آن توجهات زیادی را در واکنش‌های کاتالیزگری به خود اختصاص داده است (۱۴). شیمی کلیک واکنش بین آزید و آلکین است که منجر به محصول 1,2-disubstituted 1,2,3-triazole می‌شود (۱۵، ۱۶). این فرآیند هم‌چنین به‌عنوان CuAAC (Cu catalyzed alkyne azide cycloaddition) شناخته شده است. اساس شیمی کلیک بر تجزیه مس است و اغلب کاتالیزور این واکنش مجموعه Cu-TBTA است (۱۷، ۱۸). شیمی کلیک کاربرد زیادی در علم پزشکی برای تهیه بیوسنسورهای تشخیصی و در تحویل هدفمند داروهای نانوذرات دارد (۱۹، ۱۱). از شیمی کلیک برای تثبیت شیمیایی یک پپتید که شامل ۱۱ اسید آمینه و RGD پپتید خطی است و پپتید بیولوژیک RADA16 است بر روی سطوح استفاده شده است (۲۰، ۲۱). از آنجایی که بار و توالی اسیدهای آمینه در مراحل تثبیت سازی پپتید و پروتئین روی سطوح نقش اساسی دارد و در نهایت طرز قرار گرفتن پپتید روی سطوح تثبیت شده، فعالیت بیولوژیک پپتید را تحت تأثیر قرار می‌دهد، و از آنجایی که تاکنون تثبیت شیمیایی RGD حلقوی به روش شیمی کلیک بر روی سطح سیلیکون گزارش نشده است، در این مقاله از پپتید حلقوی (arg-gly-asp-d-phe-val) که داری ۶ آمینو اسید است استفاده شده است تا از طریق شیمی کلیک بر روی سطح سیلیکون تثبیت شیمیایی شود. بدین منظور ابتدا پپتید حلقوی فوق به صورت محافظت نشده به‌طور اختصاصی به ۴-آزیدو فنل ایزوتیوسیانات متصل می‌گردد. محصول این روش نیاز به تصفیه و خالص سازی ندارد و بازده بالایی دارد (۲۰). سپس از ۱ و ۸ نونادیان استفاده گردید تا گروه عاملی استیلن را در طی یک مرحله و توسط نور UV بر روی سطح سیلیکون ایجاد شود. در مرحله بعد آزیدو پپتید حلقوی در حضور مس بر روی سطح سیلیکون به-طور اختصاصی تثبیت می‌گردد. لایه پپتید تثبیت شده روی سطح سیلیکون توسط تکنیک‌های XPS و FTIR مورد بررسی قرار می‌گیرد. در مرحله بعد سلول‌های فایبروبلاست انسانی بر روی سطح پپتید حلقوی و ۱ و ۸ نونادیان به‌عنوان کنترل کشت داده شدند تا مورفولوژی، چسبندگی سلولی،

(۱، ۲). کلید موفقیت در این زمینه تثبیت ماده بیولوژیکی با غلظت بالا، از طریق سایت مخصوص و حفظ فعالیت بیولوژیکی در فضایی از بستر تعیین شده است به‌طوری‌که قسمت هدف یا فعال آن دست نخورده باقی بماند. یک فاکتور مهم برای تداخلات بیومولکولی در دسترس بودن مولکول هدف است که آزادی کافی برای تغییر شکل فضایی مولکول هدف روی سطوح داشته باشد (۳-۱). پپتید RGD از مهم‌ترین سکانس‌ها در اتصال به ماتریکس خارج سلولی است و از سه آمینواسید آرژنین، گلیسین و اسپارتیک اسید تشکیل شده است. این سکانس یکی از توالی‌های غالب شناساگر سلولی است و در بسیاری از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی وجود دارد (۴). سکانس پپتید RGD به روش‌های متعدد فیزیکی و شیمیایی بر روی سطوح تثبیت گردیده است (۵) و باعث افزایش چسبندگی سلولی، تکثیر و گسترش سلولی می‌گردند (۵) پپتید RGD به دو فرم خطی و حلقوی وجود دارد و پپتید حلقوی نسبت به خطی پایدارتر است و به‌طور مستقیم با اینترگرین $\alpha V\beta 3$ تداخل می‌کند (۶). اینترگرین‌ها از مهم‌ترین گیرنده‌های سلولی هستند که این سکانس RGD را شناسایی می‌کند و به این سکانس متصل می‌گردد و در بسیاری از رفتارهای سلولی همانند تکثیر، تمایز، دخالت دارد. این سکانس در میان بسیاری از پروتئین‌های خارج سلولی شامل فیبرونکتین، فیبرونوژن، ویترونکتین و استرپتوپونین یافت می‌گردد و در بعضی از سرطان‌ها، میزان بیان این پروتئین‌های غشایی افزایش می‌یابد (۷). بنابراین پپتید RGD هم‌چنین می‌تواند در ساخت مواد هوشمند چند منظوره که به‌طور هوشمند تومور را مورد هدف قرار می‌دهند به‌کار رود (۸). اکثر روش‌های تثبیت سازی نیاز به عامل محافظت کننده دارد که این امر باعث افزایش هزینه و پیچیدگی واکنش می‌گردد (۹). بنابراین ایجاد یک روش ساده برای تثبیت پروتئین‌ها و پپتیدها روی سطوح که سبب ایجاد غلظت بالای ماده بیولوژیک گردد و فعالیت قسمت بیولوژیکی آن حفظ شود و در عین حال پپتید هدف، آزادی کافی جهت تداخلات بیومولکولی داشته باشد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از آنجایی که روش مناسب جهت تثبیت شیمیایی مواد بیولوژیکی می‌تواند بستری مناسب برای توسعه بیوسنسورهای تشخیصی برای پیش‌تر بیماری‌ها باشد (۱۰)، لذا در این مقاله از شیمی کلیک Click chemistry برای تثبیت شیمیایی پپتید حلقوی بر روی سطح سیلیکون استفاده می‌شود. شیمی کلیک یک روش بسیار مؤثر و انتخابی برای واکنش حلقه-

توانایی زنده ماندن و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی سطوح بیان شده مورد بررسی قرار گیرد.

مواد

تمام مواد شیمیایی از شرکت سیگما خریداری گردیدند. سکانس پپتید حلقوی (arg-gly-asp-d-phe-val) با خلوص ۹۷٪ از سیگما خریداری گردید. سلول‌های فیبروبلاست انسانی (HDF; line GM3348) هم‌چنین از سیگما خریداری گردید.

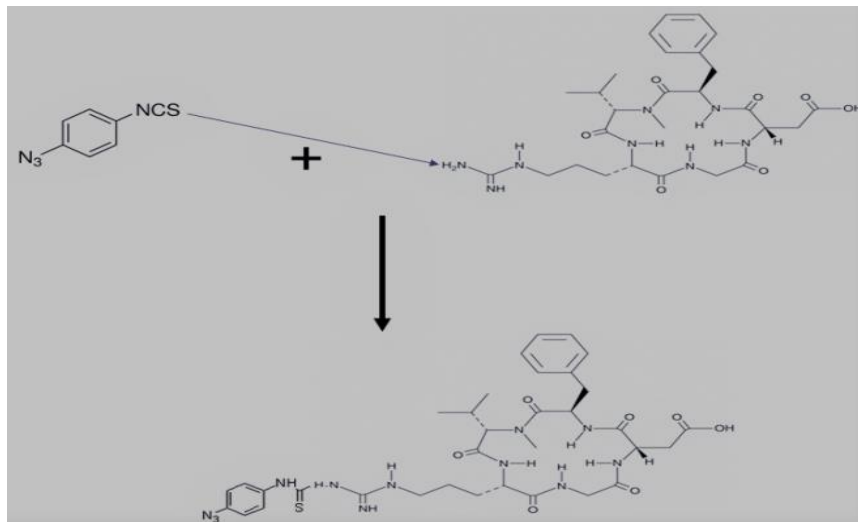
تثبیت شیمیایی آزیدو پپتید روی انتهای سطح عامل دار شده با استیلن

تثبیت تک لایه ۸ نانودیان بر روی سطح سیلیکون
برای ایجاد تک لایه ۱ و ۸ نانودیان بر روی سطح سیلیکون، سطح سیلیکون ابتدا با استون و سپس متانول ۵ دقیقه سونیکه می‌گردد و سپس سطح سیلیکون با محلول پیرانا که شامل ۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه و ۷ میلی‌لیتر اسید سولفوریک است به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد تمیز می‌گردد. به‌منظور بر طرف کردن لایه اکسیدی از سطح سیلیکون به مدت ۲۰ دقیقه در مجاورت آمونیوم فلوراید ۴۰ درصد قرار می‌گیرد و در عین حال از گاز آرگون استفاده می‌شود تا از اکسیداسیون لایه مذکور جلوگیری گردد که در نهایت یک لایه اتم هیدروژن روی

سطح سیلیکون قرار می‌گیرد. سپس سیلیکون به مدت ۳ ساعت در مجاورت ۱ و ۸ نانودیان هم‌زمان تحت جریان گاز نیتروژن قرار می‌گیرد که خود آرایه تک لایه ۱ و ۸ نانودیان تشکیل یک ساختار منظم مولکولی را می‌دهد و یک سطح عامل‌دار شده استیلنی ایجاد می‌گردد (۱۲،۲۱).

اصلاح RGD پپتید به‌وسیله ۴-آزیدو فنل ایزوتیوسیونات

RGD پپتید حلقوی با ۴-آزیدو فنل ایزوتیوسیونات که از نظر تجاری در دسترس است واکنش داده می‌شود (شکل ۱) تا آزیدو پپتید تیو اوره تشکیل شود که نه تنها نیازی به تصفیه و خالص سازی ندارد بلکه نیازی به پوشاندن گروه‌های عاملی ندارد. بدین‌منظور ابتدا ۷ میلی‌گرم ۴-آزیدو فنل ایزوتیوسیونات در ۳ میلی‌لیتر دای متیل سولفوکساید حل می‌شود (محلول شماره ۱). سپس ۵ میلی‌گرم پپتید در ۱ میلی‌لیتر اتانول حل می‌شود و پس از افزودن ۵ میلی‌مول تری اتانولامین و ۵۰۲ میلی‌مول محلول شماره ۱، مخلوط حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت بهم زده می‌شود و بعد از جدا نمودن حلال، ۲۵ میلی‌لیتر دی اتیل اتر سرد اضافه می‌شود تا پپتید رسوب داده شود و سپس رسوب به‌وسیله فیلتراسیون تحت جریان نیتروژن جمع‌آوری می‌گردد (۲۰).



شکل ۱. واکنش بین پپتید (arg-gly-asp-d-phe-val) و ۴-آزیدو فنیل ایزوتیوسیانات را نشان می‌دهد.

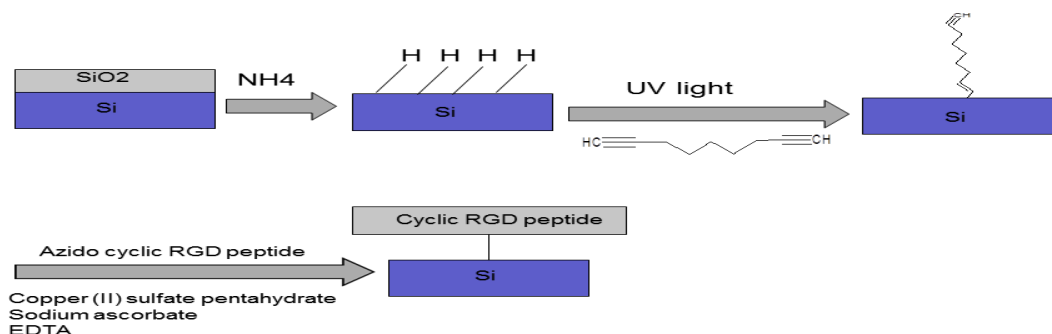
واکنش داده و آزیدو پپتید به‌طور شیمیایی بر روی سطح سیلیکون تثبیت می‌گردد (شکل ۲). بدین‌منظور، سیلیکون عامل‌دار شده در مجاورت محلول آزیدو پپتید، مس سولفات پنتاهیدرات (۱ مول) و سدیم اسکورات (۱۰ مول) قرار می‌گیرد. واکنش در دمای اتاق و به مدت ۲۴ ساعت طول می‌کشد.

تثبیت پپتید حلقوی بر روی سطح سیلیکون عامل دار شده با ۱ و ۸ نانو دیان

آزیدو پپتید تهیه شده در مرحله قبل سپس به‌وسیله واکنش با لایه ۱ و ۸ نانو دیان ایجاد شده بر روی سطح سیلیکون

مدت ۲۴ ساعت در مجاورت EDTA در pH 7.4 قرار می‌گیرد. سپس سطح سیلیکون دوباره با آب مقطر شستشو داده می‌شود (۲۱).

کشد و یک واکنش حلقوی که به وسیله مس کاتالیز می‌شود تشکیل می‌گردد. سطح سیلیکون سپس به ترتیب با هگزان، اتیل استات، اتانول و آب شستشو داده می‌شود و سپس به-



شکل ۲. روش تثبیت تک لایه ۸ و ۱ نانودیان و پپتید حلقوی RGD بر روی سطح سیلیکون به روش شیمی کلیک

اتمسفر مرطوب با غلظت ۵٪ CO کشت داده می‌شوند. سلول‌های فایبروبلاست از محیط کشت به وسیله تریپسین ۲۵٪ به مدت ۵ دقیقه جدا شده و به پلیت‌های ۶ خانه حاوی سطح سیلیکون که با ۱ و ۸ نانودیان و RGD سیکلیک پپتید عامل‌دار شده‌اند اضافه می‌شود (۵، ۲۱).

آزمون چسبندگی سلولی

در این آزمایش حدود 5×10^5 سلول فایبروبلاست انسانی بر روی سطح سیلیکون و یفرکه با RGD پپتید حلقوی عامل‌دار شده‌اند و ۱ و ۸ نانودیان به‌عنوان سطح کنترل استفاده می‌شود. آزمون چسبندگی برای فواصل زمانی مختلف (۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انجام داد. بعد از فاصله زمانی مشخص کشت سلول‌ها، سطح سیلیکون با فسفات بافر دو بار شستشو داده می‌شود. سلول‌های فایبروبلاست از سطح سیلیکون آزیدو پپتید و سطح کنترل به وسیله تریپسین جدا شده و تعداد سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و هموسایتومتر شمارش می‌گردند. این آزمون سه بار تکرار می‌گردد (۵).

آزمون فعالیت متابولیک سلولی

در این آزمایش کمابیش 5×10^5 سلول به پلیت‌های ۲۴ خانه که حاوی یفر و سیلیکون عامل‌دار شده با آزیدو پپتید است و ۱ و ۸ نانودیان به‌عنوان کنترل استفاده می‌شود. سلول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵٪ CO₂ کشت داده می‌شوند. سپس در

X-ray فتوالکترون اسپکتروسکوپی

x-ray فتوالکترون اسپکتروسکوپی یک تکنیک آنالیز سطح است که اطلاعات شیمیایی و ترکیبی سطح را فراهم می‌کند. این روش در مواردی به نام طیف‌بینی الکترونی برای آنالیز شیمیایی Electron Spectroscopy for Chemical Analysis با نام اختصاری ESCA، نیز شناخته می‌شود. در این روش تمام طیف عناصر جزء هیدروژن و هلیوم امکان به‌وسیله اسپکترومتر ESCALAB 220iXL، یک منبع مونوکروماتیک Al KR و یک ردیاب چند کاناله به‌دست آمدند. طیف‌ها در زاویه ۹۰ درجه و در فشار کم‌تر از 10^{-6} پاسکال به‌دست آمد (۳۵).

اینفرارد اسپکتروسکوپی ATR-FTIR

ATR-FTIR اسپکترومتر به عنوان روشی پر قدرت برای تعیین ساختار و شناسایی ترکیب‌های آلی، پیوندهای شیمیایی و شناسایی گروه‌های عاملی و ساختار مولکولی به‌کار می‌رود. طیف‌ها در دامنه طیفی $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ و وضوح طیفی 4 cm^{-1} جمع‌آوری شدند (۲۵).

کشت سلولی سلول‌های فایبروبلاست

در این مرحله از سلول‌های فایبروبلاست انسانی استفاده می‌گردد که در محیط DMEM غنی شده با سرم جنین گاو ۱۰٪ حجمی و FBS و ۱٪ V/V پنی‌سیلین/استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک

زمان‌های مشخص شده (۲۴ و ۴۸) ساعت، ویفر سیلیکون‌ها با بافر PBS، سه بار شستشو می‌شوند و سپس در محیط کشتی که شامل ۲۰٪ MTT است غوطه‌ور می‌گردند. واکنش به مدت یک ساعت انجام می‌شود و سپس جذب در ۴۹۰ نانومتر ثبت می‌گردد (۴،۲۱).

میکروسکوپ الکترونی روبشی

میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM برای بررسی مورفولوژی نمونه‌ها استفاده گردید. بعد از کشت سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی سطح سیلیکون عامل‌دار شده با پتید و ۱ و ۸ نانودیان، سلول‌های فایبروبلاست چسبیده شده روی سطح سیلیکون با ۲/۵٪ V/V گلو تار آلدئید برای مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه فیکس می‌شوند. سپس به منظور جدا کردن آب از نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه به ترتیب در اتانول ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد خشک می‌شوند و بعد از خشک کردن کامل نمونه‌ها با طلا پوشیده می‌شوند (۲۱).

میکروسکوپ روبشی هم کانون لیزری

میکروسکوپ لیزری هم کانون یا Nikon برای تعیین قابلیت زنده ماندن نمونه‌ها استفاده می‌گردد. یک دیود پالس لیزری برای انجام فلورسنت میکروسکوپی در حالت limbo است. پروپدیوم یداید و فلورسین دی استات در بافر PBS برای ارزیابی زنده بودن سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت مورد استفاده قرار می‌گیرد. سلول‌های فلورسنت شده با قرمز به عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های سبز به عنوان سلول‌های زنده هستند (۴).

مطالعه‌های آماری

هر تست سه بار تکرار شده است. نتایج هر تست بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. به منظور مقایسه میانگین‌ها از آزمون t-test استفاده شد و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی سطح سطوح سیلیکون عامل‌دار شده با آزیدو

پتید با XPS

آنالیز XPS (طیف سنجی فوتوالکترون اشعه ایکس) از روش‌های آنالیز سطحی برای بررسی سطح مواد از نقطه نظر آنالیز عنصری، ترکیب شیمیایی و تعیین حالت پیوندی است. تست XPS جزء روش‌های غیرمخرب محسوب می‌شود که آسبایی به نمونه وارد نمی‌کند. شکل ۳ نتایج طیف XPS

به دست آمده از سطح سیلیکون عامل‌دار شده با ۱ و ۸ نانودیان، و پتید حلقوی RGD را نشان می‌دهد که وجود سیلیکون، کربن و اکسیژن را در سطح سیلیکون عامل‌دار شده با ۱ و ۸ نانودیان تأیید می‌نماید که مطابق با گزارش‌های مقالات دیگر است و نشان‌دهنده تثبیت با ۱ و ۸ نانودیان بر روی سطح سیلیکون است (۲۰،۲۲). وجود مقدار کم اکسیژن به علت جذب کم اکسیژن توسط سطح سیلیکون است (۲۲).

بعد از تثبیت شیمیایی پتید حلقوی RGD به روش شیمی کلک بر روی سطح سیلیکون، طیف XPS، وجود سیلیکون، کربن، اکسیژن و نیتروژن را تأیید می‌کند که نشان‌دهنده وجود پتید بر روی سطح سیلیکون است (۲۳). طیف باریک Si2p کیفیت سطح و عدم وجود سیلیکون اکسید را در سطح سیلیکون عامل‌دار شده با ۱ و ۸ نانودیان و آزیدو پتید به ترتیب نشان می‌دهد. در غیر این صورت یک پیک بین eV ۱۰۲ و ۱۰۴ دیده می‌شد (۲۴).

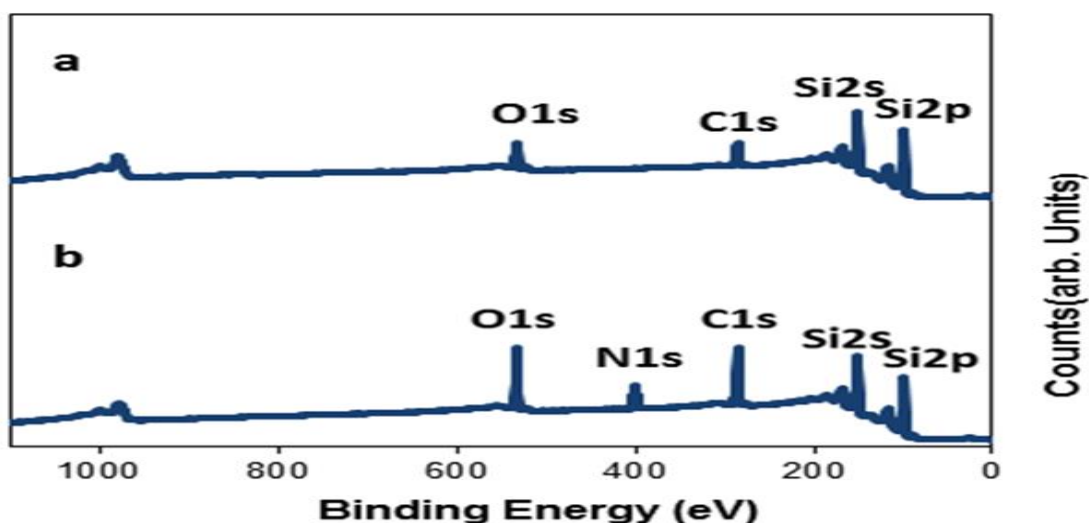
نسبت طیف کربن بعد از اتصال شیمیایی پتید نسبت به طیف کربن در ۱ و ۸ نانودیان افزایش می‌یابد که نشان‌دهنده افزایش مقدار کربن به واسطه پتید روی سطح سیلیکون است (۲۰،۲۵). طیف اسکن باریک کربن یک ساختار غنی را نشان می‌دهد که به علت وجود ۵ گروه کربنی در ساختار آن است. یک پیک در eV ۲۸۴/۲ که مربوط به اتصال کربن به سطح سیلیکون است. پیک انرژی در ناحیه eV ۲۸۴/۸ مربوط به باند کربن - کربن در پتید است. پیک انرژی در ناحیه eV ۲۸۶ را می‌توان به گروه (C\N) پتید نسبت داد (۲۰).

گروه (O_C\N) یا (O_C\O) پتید سبب ایجاد یک پیک در ناحیه eV ۲۸۸/۳ می‌شود. در ناحیه eV ۲۸۹ یک پیک است که در نتیجه حضور گروه O C (O) اسپارتیک اسید است (۲۱،۲۶،۲۷).

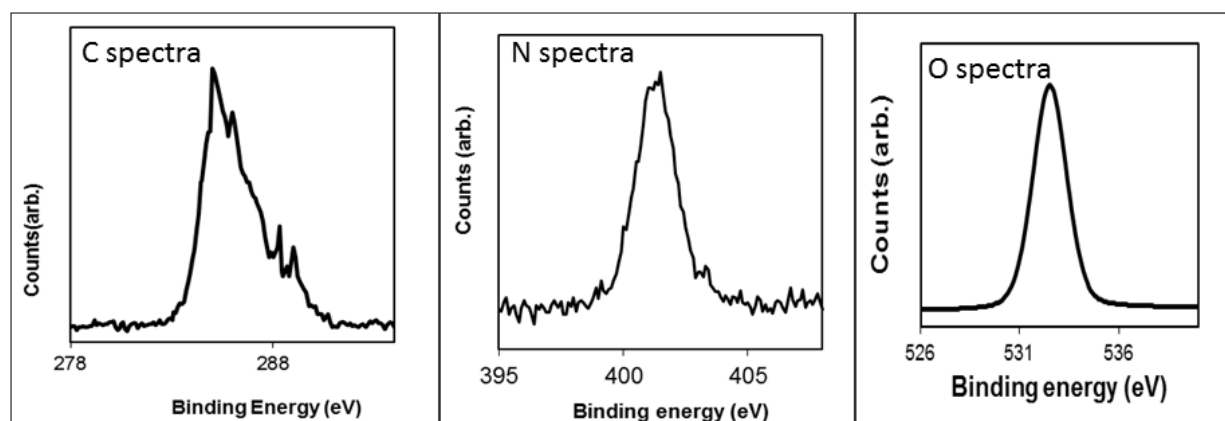
هم‌چنین بعد از اتصال شیمیایی پتید به سطح سیلیکون، پیک نیتروژن به طیف XPS اضافه می‌شود که نشان‌دهنده وجود پتید بر روی سطح سیلیکون است. این پیک در ناحیه eV ۴۰۰ مربوط به آمین‌های آزاد گروه است (۲۸). برای محاسبه غلظت پتید بر روی سطوح، یکی از متدها اندازه‌گیری نسبت اتم نیتروژن به نسبت اتم کربن است که در این مطالعه نسبت N/C ۰/۲۷ به دست آمد. هم‌چنین بعد از اتصال شیمیایی آزیدو پتید حلقوی به سطح سیلیکون،

دست آمده با مقادیر گزارش شده برای اجزای مشابه طیف پپتیدها بر روی سطوح مطابقت زیادی دارد (۲۱،۲۶).

ایجاد پیک انرژی اکسیژن در ناحیه $532/31 \text{ eV}$ مربوط به گروه O_{1s} پپتید است (۲۹). نتایج به دست آمده وجود پپتید را بر روی سطح سیلیکون تأیید می نماید. نتایج به-



شکل ۳. طیف XPS بر روی سطح (a) ۸ نونادیان و (b) پپتید را نشان می دهد.

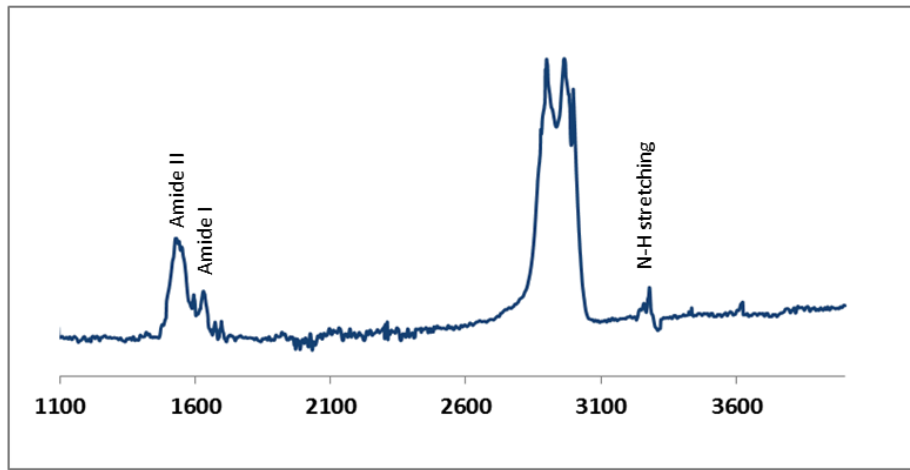


شکل ۴. طیف اسکن باریک XPS کربن، نیتروژن و اکسیژن را نشان می دهد.

است. باند امید نوع II با شدت متوسط در ناحیه cm^{-1} ۱۵۵۰ دیده می شود (۲۳،۳۰). شواهد حاکی از آن است که باند مربوط به جذب استیلن، حلقه بنزن، گروه آروماتیک و گروه فنیل اسید آمینه فنیل آلانین با باند امید I و امید II هم پوشانی می کند و قادر نیست پیک مجزا ایجاد نماید (۳۱). این پیکها نشان دهنده تثبیت پپتید روی سطح سیلیکون است (۲۳).

بررسی سطح سطوح سیلیکون عامل دار شده با آزیدو پپتید با ATR-FTIR

شکل ۵ نتایج حاصل از اینفرارد اسپکتروسکوپی ATR-FTIR را نشان می دهد بعد از شیمی کلیک پپتید حلقوی RGD، باند امید I با شدت کم در ناحیه 1630 cm^{-1} و یک پیک دیگر در حوالی 3280 cm^{-1} که مربوط به باند امیدی است نشان دهنده ساختار فضایی دوم پپتید به فرم صفحه بتا



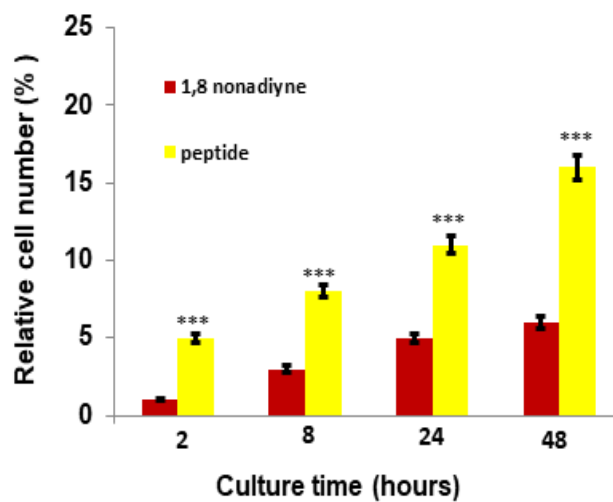
شکل ۵. نتایج FTIR حاصل از شیمی کلیک پپتید حلقوی RGD را روی سطح سیلیکون نشان می‌دهد.

سلول‌های چسبیده بر روی سطوح عامل‌دار شده با پپتید حلقوی در ۲ ساعت اول و کمابیش در تمام زمان‌های اندازه‌گیری شده به‌طور تقریبی سه برابر بیش‌تر از سطوح کنترل است. تفاوت چشم‌گیر در تعداد سلول‌های اولیه چسبیده بر روی پپتید حلقوی RGD نشان می‌دهد که رویدادهای اتصال اینتگرین که چسبندگی سلول را ممکن می‌سازد با مقدار زیاد سلول چسبیده بر روی سطح پپتید رخ می‌دهد. این نتایج بیش‌تر از مطالعه‌های قبلی است که پپتید خطی RGD به‌صورت کوالانسی به سطوح متصل شده بود است (۴).

پاسخ سلول‌های فایروبلاست انسانی به سطوح

سیلیکون عامل‌دار شده با پپتید حلقوی RGD

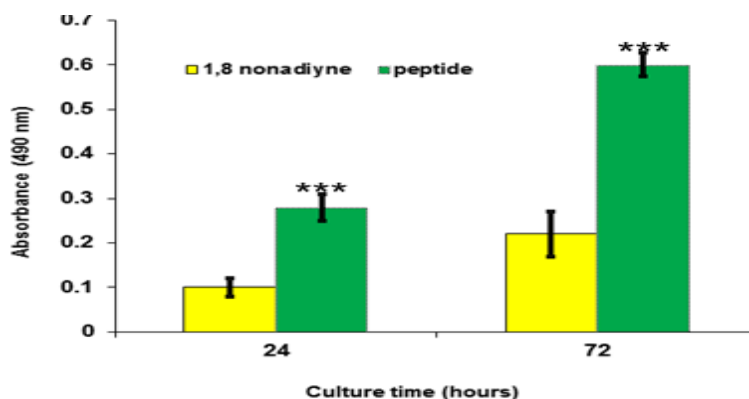
سلول‌های فایروبلاست انسانی بر روی ۱ و ۸ نونادیان و آزیدو پپتید در شرایط بدون سرم کشت داده شدند تا عملکرد آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. تعداد سلول‌های فایروبلاست چسبیده به سطح ۱ و ۸ نونادیان و آزیدو پپتید بعد از (۲، ۸، ۲۴ و ۴۸) ساعت بررسی گردیدند. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌گردد چسبندگی و تکثیر سلول‌ها بر روی سطوح کنترل ۱ و ۸ نونادیان در مقایسه با سطوح تعبیه شده با پپتید بسیار محدودتر است. در واقع تعداد



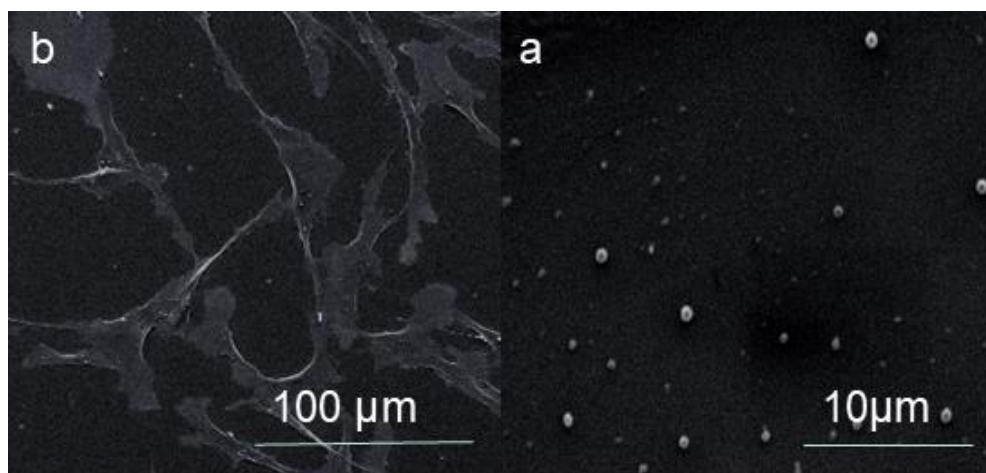
شکل ۶. چسبندگی سلول به ۱ و ۸ نونادیان و پپتید روی سطح سیلیکون در دوره‌های زمانی متفاوت (۲، ۸، ۲۴ و ۴۸) ساعت نشان می‌دهد. هر تست سه بار تکرار شده است. نتایج هر تست بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. تعداد سلول‌های چسبیده به سطح پپتیدی در تمام مقطع زمانی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سطح کنترل ($P < 0.001$) است.

در مرحله بعد، مورفولوژی، چسبندگی و گسترش سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی دو سطح پپتید حلقوی و سطح کنترل توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌گردد سلول‌های فیبروبلاست انسانی چسبیده بر روی سطوح عامل‌دار شده با پپتید حلقوی دارای دندریته‌های طولانی و گسترش یافته هستند و بدن سلول‌ها تماس نزدیکی با سطح پپتید دارند. در صورتی‌که بر روی سطح کنترل سلول‌ها درست نچسبیده‌اند و تعداد آن‌ها اندک و شکل دایره‌ای رشد نیافته دارند.

برای بررسی بیش‌تر عملکرد سلول‌ها بر روی سطح پپتید از آزمون MTT استفاده می‌گردد تا تکثیر سلول‌های زنده را روی دو سطح (عامل‌دار شده با ۱ و ۸ نونادیان و آزیدو پپتید) در ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی نمایند. نتایج آزمون MTT بر روی دو سطح در شکل ۷ آورده شده است. همان‌طور که می‌بینید سرعت تکثیر سلول‌های فایبرو بلاست در تمام زمان‌های بررسی شده بر روس سطوح عامل‌دار شده با پپتید حلقوی دو برابر و نیم بیش‌تر از سطوح کنترل است که این نتایج هم‌چنین بیش‌تر از مطالعه‌های قبلی است که پپتید خطی RGD به‌صورت کوالانسی به سطوح متصل شده بودند است (۴).



شکل ۷. تعداد سلول‌های زنده روی سطح به ۱ و ۸ نونادیان و پپتید را بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می‌دهد. نتایج هر تست بر اساس میانگین \pm انحراف معیار بیان شده است. تعداد سلول‌های زنده روی سطح پپتیدی در تمام مقطع زمانی به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سطح کنترل ($P < 0.001$) است.



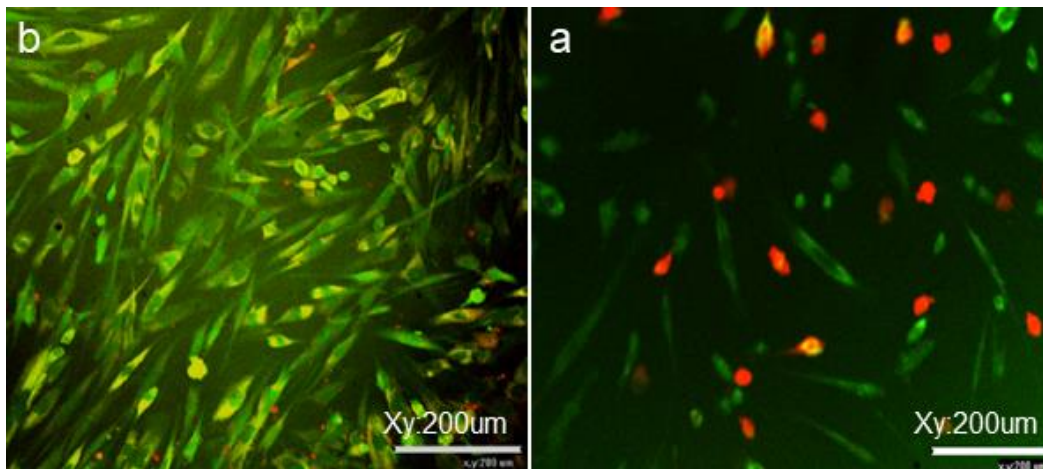
شکل ۸. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM را از سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطح ۱ و ۸ نونادیان (a) و پپتید (b) را بعد از ۴۸ ساعت نشان می‌دهد.

شده به‌طور یکنواختی بر روی سطح پپتید حلقوی توزیع گردیده‌اند. در صورتی‌که تعداد خیلی کمی از سلول‌های فیبروبلاست زنده و به‌طور غیر یکنواخت بر روی سطح کنترل دیده می‌شود. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه-

تصاویر حاصل از کانفوکال میکروسکوپی هم کانون بر روی سطح پپتید حلقوی و سطوح کنترل بعد از ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۹). سلول‌های فیبروبلاست بعد از ۴۸ ساعت تعداد زیادی سلول زنده به‌صورت کشیده و طولی

های قبلی که پپتید خطی RGD به صورت کوالانسی بر روی سطوح متصل شده بود نشان می دهد پاسخ سلولی سلول های فیبروبلاست بر روی سطوح عامل دار شده با پپتید حلقوی

RGD به طور قابل ملاحظه ای بهتر از سطوحی است که با پپتید خطی RGD عامل دار شده اند (۴).



شکل ۹. تصاویر حاصل از کانفوکال میکروسکوپی را از سلول های فیبروبلاست بر روی سطح ۱ و ۸ نونادیان (a) و پپتید (b) را بعد از ۴۸ ساعت نشان می دهد.

بحث

به منظور بررسی اثر سلول های فایبروبلاست انسانی بر روی پپتید حلقوی RGD، ابتدا لایه منومری ۸،۱ نونادیان بر روی سطح سیلیکون ایجاد گردید و سپس آزیدو پپتید حلقوی بر روی لایه مذکور به طور شیمی کلک تثبیت گردید. نتایج آزمایش های XPS و FTIR وجود پپتید را بر روی سطح سیلیکون تأیید نمود. سپس مورفولوژی، چسبندگی سلولی، توانایی زنده ماندن و تکثیر سلول های فیبروبلاست انسانی بر روی سطح پپتید و ۱،۸ نونادیان مورد بررسی قرار گرفت. قدرت چسبندگی سلولی اولین رویداد در پاسخ سلول به زیست ماده است و توسط سه عامل زیر (۱) میل ذاتی برای اتصال بین رسپتور و لیگاند (۲) در دسترس بودن لیگاند روی سطح و (۳) آزادی عمل سوبسترا و لیگاند برای اتصال به همدیگر کنترل می گردد.

نتایج پاسخ سلول های فایبروبلاست انسانی به سطوح سلیکون عامل دار شده با پپتید حلقوی نشان داد که پاسخ سلولی سلول های فیبروبلاست بر روی سطوح عامل دار شده با پپتید حلقوی RGD به طرز چشم گیری بیش تر از سطوح کنترل است. یکی از عامل های تعیین کننده پاسخ سلولی، تراکم و غلظت پپتید بر روی سطح سوبسترا است. افزایش نسبت نیتروژن به کربن N/C جهت تعیین غلظت پپتید بر روی سطح پپتید به کار می رود (۳۲). نتیجه مطالعه های قبلی یک ارتباط مستقیم بین غلظت پپتید روی سطح و

چسبندگی سلولی، زنده ماندن سلولی و تکثیر سلولی را نشان داده است (۳۳،۳۴). نسبت نیتروژن به کربن N/C در این تحقیق ۰/۲۷ است و در تحقیقات قبلی، نسبت نیتروژن به کربن N/C در پپتید خطی RGD به روش لینکر EDC و NHS (۳۵) ۰/۲۴ و به روش شیمی کلک ۰/۲۶ (۲۰) گزارش شده است. نظر به این که غلظت پپتید حلقوی RGD در این مطالعه و غلظت پپتید خطی RGD در مطالعه های قبلی روی سطح سیلیکون کمابیش مشابه است، ولی پاسخ سلولی بر روی پپتید حلقوی RGD بهتر از پپتید خطی RGD است که می تواند به دلیل در دسترس بودن بهتر پپتید حلقوی RGD که سبب ارائه و عرضه بهتر لیگاند RGD به گیرنده های اینتگرین سلول ها می شود و در نهایت سبب افزایش پاسخ سلولی می شود. همان طور که در تحقیق های قبلی ذکر شده است لینکر نقش مهمی در دسترس قرار دادن سایت هدف به رسپتور های اینتگرین دارد (۵). در مقاله های قبلی به منظور بهتر عرضه شدن پپتید خطی RGD به اینتگرین از ۷ اسید آمینه که شامل ۴ اسید آمینه آلانین و ۳ اسید آمینه گلايسین است به عنوان لینکر استفاده می شود، از طرف دیگر غلظت پپتید حلقوی در این مقاله کمابیش با غلظت پپتید خطی در مطالعه های قبلی مشابه است ولی پاسخ سلولی در این تحقیق که شامل چسبندگی سلولی، تکثیر، مورفولوژی و تعداد سلول های زنده بیش تر از سطوحی است که با پپتید خطی RGD پوشیده شده اند. این نتایج هم چنین نشان دهنده حفظ فعالیت

تری جهت تأیید این کارایی بیولوژیکی این سطوح ضروری است.

نتیجه گیری

پپتید حلوی حاوی سکانس RGD با ۴- آزیدو فنل ایزوتیوسیانات به طور اختصاصی واکنش می دهد و آزیدو پپتید ایجاد می کند که به طور اختصاصی با گروه استیلین روی سطح سیلیکون واکنش می دهد و سبب تثبیت شیمیایی پپتید بر روی سطح سیلیکون می گردد. آزمایش- های XPS و ATR-FTIR وجود پپتید را بر روی سطح سیلیکون تأیید نمودند. آزمایش های کشت سلولی نشان داد که پپتید تثبیت شده بر روی سطح سیلیکون باعث افزایش قابل ملاحظه پاسخ سلولی که شامل (مورفولوژی، چسبندگی، تکثیر و زنده ماندن سلول های فیروبلست) نسبت به سطح کنترل می گردد. اگرچه آزمایش های تأیید می کنند که این سطوح زیست سازگار هستند ولی آزمایش- های بیش تری نیاز است به منظور این که کارایی آن ها در کاربردهای پزشکی و تشخیصی تأیید گردد.

سپاسگزاری

از دانشگاه مهندسی مولکولی دانشگاه سیدنی و همکارانی که در این پروژه مرا کمک کردند بسیار سپاسگزارم.

بیولوژیکی پپتید حلقوی به روش شیمی کلیک بر روی سطح سیلیکون است.

افزایش پاسخ سلولی بر روی سطوحی که با RGD حلقوی پوشیده شده اند ممکن است به علت انعطاف پذیری و در دسترس بودن بهتر RGD حلقوی نسبت به RGD خطی است (۳۶). تغییرهای ساختاری و جهت گیری اسیدهای آمینه در ساختار پپتید نقش اساسی را در شناسایی رسپتورها اعمال می کند (۳۷). مطالعه های قبلی نشان داده- اند که RGD پپتید حلقوی افینیتی بیش تری برای اتصال به رسپتورهای اینترگرین در مقایسه با RGD خطی دارد که باعث می گردد رسپتورهای اینترگرین به طور مؤثرتری به RGD حلقوی متصل گردند. از طرف دیگر قابل انعطاف بودن ساختار سه بعدی پپتید RGD خطی آن را غیر پایدار می سازد، در صورتی که ساختار سه بعدی RGD حلقوی باعث پایداری ساختار پپتید می گردد و سبب می گردد اتصال آن به اینترگرین مؤثرتر از پپتید RGD خطی گردد (۳۸،۳۹).

کاهش پاسخ سلولی پپتید RGD خطی ممکن است به علت در دسترس قرار نگرفتن مناسب لیگاند به وسیله رسپتور باشد که باعث کاهش اتصال های مؤثر بین لیگاند و رسپتور می گردد. محدودیت تعداد باندهای مؤثر در RGD خطی باعث کاهش چسبندگی سلول به سطوح می گردد که این امر مانع گسترش سلول های چسبیده بر روی سطح می گردد (۴۰). هم چنین در بعضی تکنیک های تثبیت کننده پپتید به طریق شیمیایی، تغییر قابل توجه در ساختار فضایی اینترگرین رخ می دهد که به طور قابل ملاحظه ای سبب کاهش افینیتی بین رسپتور و لیگاند می گردد. بنابراین قسمت کمی از پپتید جذب شده روی سطح از نظر ساختار فضایی برای رسپتورهای چسبندگی سلولی در دسترس است که باعث کاهش پاسخ سلولی می گردد. گسترش سلول ها بر روی سطح عامل دار شده به تعداد و توزیع سایت های اتصال پپتید و قابلیت دسترسی بودن آن ها بستگی دارد (۴۱،۴۲). بنابراین گسترش سلول های فیروبلست بر روی سطوح پپتید حلقوی ممکن است تعداد بیش تری از لیگاندها بر روی پپتید با رسپتورهای سلولی متصل شوند که نیروی کششی و پشتیبانی مکانیکی لازم جهت گسترش ساختار سلولی را فراهم می کنند (۳۴). اگر چه این نتایج روش بهینه ای برای اتصال پپتیدهای بیولوژیک و حلقوی را با بازده بالا بر روی سطوح عامل دار شده نشان می دهد، ولی آزمایش های بیش-

1. Nagamune T. Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano Converg* 2017;4:9-.
2. Coffinier Y, Olivier C, Perzyna A, Grandidier B, Wallart X, Durand JO, et al. Semicarbazide-Functionalized Si(111) Surfaces for the Site-Specific Immobilization of Peptides. *Langmuir* 2005;21:1489-96.
3. Rusmini F, Zhong Z, Feijen J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules* 2007;8:1775-89.
4. Shamsi F. Investigation of cellular response to covalent immobilization of peptide and hydrophobic attachment of peptide amphiphiles on substrates. *Biochemical Engineering Journal* 2017;117:82-8.
5. Shamsi F. Covalent attachment of three derivatives of pegylated RGD peptides on the NH₂-terminated silicon surfaces: Impact on fibroblast cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 2021;1863:183770.
6. Liu S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptide Bioconjugates as Radiotracers Targeting Multiple Integrins. *Bioconjugate Chemistry* 2015;26:1413-38.
7. Fairman R, Åkerfeldt KS. Peptides as novel smart materials. *Current Opinion in Structural Biology* 2005;15:453-63.
8. Shamsi F. Nanotechnology application in cancer treatment. *Koomesh* 2019;21:579-89.
9. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol* 2013;6:185-205.
10. Nguyen HH, Lee SH, Lee UJ, Fermin CD, Kim M. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials (Basel)* 2019;12:121.
11. Castro V, Rodríguez H, Albericio F. CuAAC: An Efficient Click Chemistry Reaction on Solid Phase. *ACS Combinatorial Science* 2016;18:1-14.
12. Ciampi S, Böcking T, Kilian KA, Harper JB, Gooding JJ. Click Chemistry in Mesoporous Materials: Functionalization of Porous Silicon Rugate Filters. *Langmuir* 2008;24:5888-92.
13. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie International Edition* 2001;40:2004-21.
14. Devaraj NK, Finn MG. Introduction: Click Chemistry. *Chemical Reviews* 2021;121:6697-8.
15. Hudalla GA, Murphy WL. Using "Click" Chemistry to Prepare SAM Substrates to Study Stem Cell Adhesion. *Langmuir* 2009;25:5737-46.
16. Yi G, Son J, Yoo J, Park C, Koo H. Application of click chemistry in nanoparticle modification and its targeted delivery. *Biomaterials Research* 2018;22:13.
17. Meldal M, Tornøe CW. Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *Chemical Reviews* 2008;108:2952-3015.
18. Ahmad Fuaad AAH, Azmi F, Skwarczynski M, Toth I. Peptide conjugation via CuAAC 'click' chemistry. *Molecules* 2013;18:13148-74.
19. Lallana E, Sousa-Herves A, Fernandez-Trillo F, Riguera R, Fernandez-Megia E. Click chemistry for drug delivery nanosystems. *Pharmaceutical research* 2012;29:1-34.

20. Shamsi F, Coster H, Jolliffe KA. Characterization of peptide immobilization on an acetylene terminated surface via click chemistry. *Surface Science* 2011;605:1763-70.
21. Shamsi F. Investigation of human cell response to covalently attached RADA16-I peptide on silicon surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016;145:470-8.
22. Ciampi S, Böcking T, Kilian KA, James M, Harper JB, Gooding JJ. Functionalization of Acetylene-Terminated Monolayers on Si(100) Surfaces: A Click Chemistry Approach. *Langmuir* 2007;23:9320-9.
23. Shamsi F. Investigation of human cell response to covalently attached RADA16-I peptide on silicon surfaces. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces* 2016;145:470-8.
24. Haber JA, Lewis NS. Infrared and X-ray Photoelectron Spectroscopic Studies of the Reactions of Hydrogen-Terminated Crystalline Si(111) and Si(100) Surfaces with Br₂, I₂, and Ferrocenium in Alcohol Solvents. *The Journal of Physical Chemistry B* 2002;106:3639-56.
25. Shamsi F, Coster H, Jolliffe K, Chilcott T. Characterization of the substructure and properties of immobilized peptides on silicon surface. *Materials Chemistry and Physics* 2011;126:955-61.
26. Porté-Durrieu MC, Labrugère C, Villars F, Lefebvre F, Dutoya S, Guette A, et al. Development of RGD peptides grafted onto silica surfaces: XPS characterization and human endothelial cell interactions. *J Biomed Mater Res* 1999;46:368-75.
27. Polzonetti G, Battocchio C, Dettin M, Gambaretto R, Dibello C, Carravetta V, et al. Self-assembling peptides: A combined XPS and NEXAFS investigation on the structure of two dipeptides Ala-Glu, Ala-Lys. *Materials Science and Engineering: C* 2008;28:309-15.
28. Strother T, Cai W, Zhao X, Hamers RJ, Smith LM. Synthesis and Characterization of DNA-Modified Silicon (111) Surfaces. *Journal of the American Chemical Society* 2000;122:1205-9.
29. Vallée A, Humblot V, Méthivier C, Pradier C-M. Adsorption of a tripeptide, GSH, on Au(1 1 1) under UHV conditions; PM-RAIRS and low T-XPS characterisation. *Surface Science - SURFACE SCI* 2008;602:2256-63.
30. Jiang H, Guler MO, Stupp SI. The internal structure of self-assembled peptide amphiphiles nanofibers. *Soft Matter* 2007;3:454-62.
31. Kupser P, Pagel K, Oomens J, Polfer N, Kokschi B, Meijer G, et al. Amide-I and -II Vibrations of the Cyclic β -Sheet Model Peptide Gramicidin S in the Gas Phase. *Journal of the American Chemical Society* 2010;132:2085-93.
32. Iucci G, Dettin M, Battocchio C, Gambaretto R, Bello CD, Polzonetti G. Novel immobilizations of an adhesion peptide on the TiO₂ surface: An XPS investigation. *Materials Science and Engineering: C* 2007;27:1201-6.
33. Sarvestani AS, Jabbari E. Modeling cell adhesion to a substrate with gradient in ligand density. *AIChE Journal* 2009;55:2966-72.
34. Stroumpoulis D, Zhang H, Rubalcava L, Gliem J, Tirrell M. Cell Adhesion and Growth to Peptide-Patterned Supported Lipid Membranes. *Langmuir* 2007;23:3849-56.
35. Shamsi F, Coster H, Jolliffe KA, Chilcott T. Characterization of the substructure and properties of immobilized peptides on silicon surface. *Materials Chemistry and Physics* 2011;126:955-61.
36. Verrier S, Pallu S, Bareille R, Jonczyk A, Meyer J, Dard M, et al. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. *Biomaterials* 2002;23.



37. Hayflick JS, Stine J, Fox R, Hoekstra D, Gallatin WM. Functional Mapping of the Cytoplasmic Region of Intercellular Adhesion Molecule-3 Reveals Important Roles for Serine Residues. *Journal of Biological Chemistry* 1997;272:22207-14.
38. Chen Z, Deng J, Zhao Y, Tao T. Cyclic RGD peptide-modified liposomal drug delivery system: Enhanced cellular uptake in vitro and improved pharmacokinetics in rats. *Int J Nanomedicine* 2012;7:3803-11.
39. Bogdanowich-Knipp SJ, Jois DS, Siahaan TJ. The effect of conformation on the solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J Pept Res* 1999;53:523-9.
40. Lehnert D, Wehrle-Haller B, David C, Weiland U, Ballestrem C, Imhof BA, et al. Cell behaviour on micropatterned substrata: Limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of Cell Science* 2004;117:41-52.
41. Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current Opinion in Cell Biology* 2003;15:547-56.
42. Pallarola D, Platzman I, Bochen A, Cavalcanti-Adam EA, Axmann M, Kessler H, et al. Focal adhesion stabilization by enhanced integrin-cRGD binding affinity. *BioNanoMaterials* 2017;18.