



Scan online to view this article

## 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 homogenously 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

فهیمه 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 ایزوتوپوسیانات از طریق یک واکنش اختصاصی متصل می‌گردد و سپس واکنش حلقه‌ای ۱و۳-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 اینفراراد 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 مورفوЛОژی 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.

ثبت موقت یا دائمی یک بیومولکول روی سطوح ثبیت سازی نامیده می‌شود. ثبیت فیزیکی آسان‌ترین راه برای ثبیت 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 ثبیت پایدار بیومولکول‌ها روی سطح جامد کاربرد زیادی در بیوسنسورهای تشخیصی، بیوچیپ و مهندسی بافت دارد.

### مقدمه

#### 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

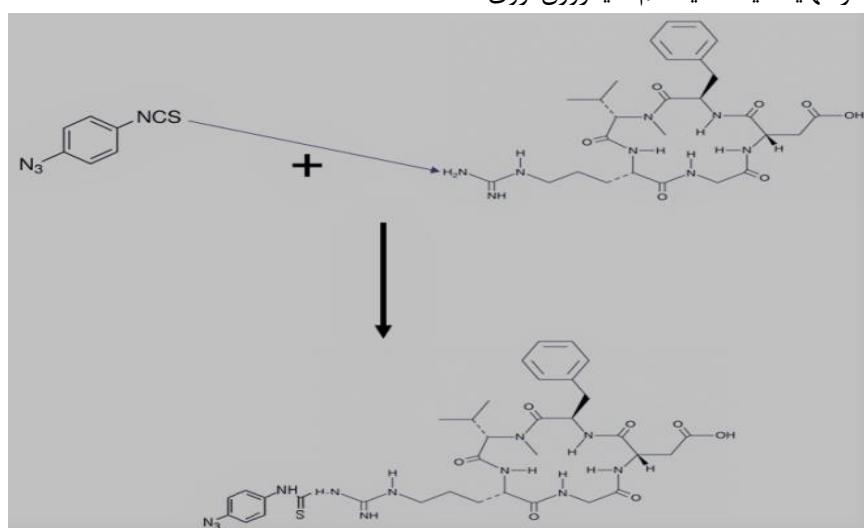
روش برای اولین بار در سال ۲۰۰۱ توسط Sharpless معرفی شد (۱۳). شیمی کلیک به علت کارایی، تطبیق پذیری و انتخاب پذیری بالای ان توجهات زیادی را در واکنش های کانژو گاسیون به خود اختصاص داده است (۱۴). شیمی کلیک واکنش بین آزید و آلکین است که منجر به محصول ۵,3-triazole 1,2-disubstituted ۱ فرآیند همچنین به عنوان 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 تحويل هدفمند داروهای نانوذرات دارد (۱۱,۱۹). از شیمی کلیک برای ثبت 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 ثبت سازی پپتید و پروتئین روی سطوح نقش اساسی دارد و در نهایت طرز قرار گرفتن پپتید روی سطوح ثبت شده، فعالیت بیولوژیک پپتید را تحت تأثیر قرار می دهد، و از آنجایی که تاکنون ثبت 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 دارای ۶ آمینو اسید است استفاده شده است تا از طریق شیمی کلیک بر روی سطح سیلیکون ثبت شیمیایی شود. بدین منظور ابتدا پپتید حلقوی فوق به صورت محافظت نشده به طور اختصاصی به ۴- آزیدو فنل ایزوتوپیوسیانات متصل می گردد. 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 ثبت شود. لایه پپتید ثبت شده روی سطح سیلیکون توسط تکنیک های XPS و FTIR مورد بررسی قرار می گیرد. در مرحله بعد سلول های فایروblast انسانی بر روی سطح پپتید حلقوی و ۱ و ۸ نونادیان به عنوان کنترل کشت داده شدند تا مورفولوژی، چسبندگی سلولی،

(۱۲). 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 بهطوری که 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 (۱-۳). پپتید RGD از مهمترین سکانس‌ها در اتصال به ماتریکس خارج سلولی است و از سه آمینواسید آرژنین، گلایسین 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 روش-های متعدد فیزیکی و شیمیایی بر روی سطوح تثبیت گردیده است (۵) و باعث افزایش چسبندگی سلولی، تکثیر و گسترش سلولی می‌گردد (۶) پپتید RGD به دو فرم خطی و حلقوی وجود دارد و پپتید حلقوی نسبت به خطی پایدارتر است و به طور مستقیم با اینتگرین  $\alpha V \beta 3$  تداخل می‌کند (۶). اینتگرین‌ها 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 استرپتوپونتین یافت می‌گردد و در بعضی از سلطان‌ها، میزان بیان این پروتئین‌های غشایی افزایش می-یابد (۷). بنابراین پپتید RGD همچنین می‌تواند در ساخت مواد هوشمند چند منظوره که به طور هوشمند تومور را مورد هدف قرار می‌دهند به کار 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 ان 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 بیشتر 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-

سطح سیلیکون قرار می‌گیرد. سیس سیلیکون بهمدت ۳ ساعت در مجاورت ۱ و ۸ نانودیان همزمان تحت جریان گاز نیتروژن قرار می‌گیرد که خود آرایی تک لایه ۱ و ۸ نانودیان تشکیل یک ساختار منظم مولکولی را می‌دهد و یک سطح عامل دار شده استینلینی ایجاد می‌گردد (۱۲.۲۱).

# اصلاح RGD بیز و تیوسیونات

RGD پپتید حلقوی با ۴-آزیدو فنل ایزوتوپیوسیونات 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 گروه-های عاملی ندارد. بدین منظور ابتدا ۷ میلی گرم ۴-آزیدو فنل ایزوتوپیوسیونات در ۳ میلی لیتر دای متیل سولفوكساید حل می‌شود ( محلول شماره ۱). سپس ۵ میلی گرم پپتید در ۱ میلی لیتر اتانول حل می‌شود و پس از افزودن ۵ میلی مول تری اتانولامین و ۵،۲ میلی مول محلول شماره ۱، مخلوط حاصل در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت بهم زده می‌شود و بعد از جدا نمودن حلال، ۲۵ میلی لیتر دی اتیل اتر سرد اضافه می‌شود تا پپتید رسوب داده شود و سپس رسوب به وسیله فیلتراسیون تحت جریان نیتروژن جمع آوری می‌گردد (۲۰).



مشکل ۱. واکنش بین پپتید (arg-gly-asp-d-phe-val) و ۴-آزیدوفنیل ایزوتیاسیانات را نشان می‌دهد.

واکنش داده و آزیدو پیتید به طور شیمیایی بر روی سطح سیلیکون تثبیت می‌گردد (شکل ۲). بدین منظور، سیلیکون عامل دار شده در مجاورت محلول آزیدو پیتید، مس سولفات پیتاھیدرات (۱۰ مول) و سدیم اسکوربات (۱۰ مول) قرار می-گیرد. واکنش، د، دمای اتاة، و به مدت ۲۴ ساعت طوا، می-

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 پیتید حلقوی (arg-gly-asp-d-phe-val) با خلوص ۹۷٪ از سیگما خریداری گردید. سلول های فیبروبلاست انسانی (HDF; line GM3348) همچنین از سیگما خریداری گردید.

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

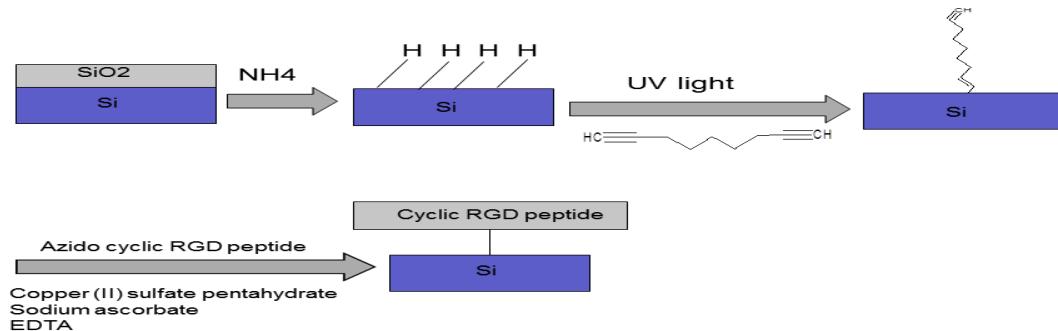
ثبتیت تک لایه او نانو دیان بر روی سطح سیلیکون  
برای ایجاد تک لایه ۱ و ۸ نانو دیان بر روی سطح سیلیکون،  
سطح سیلیکون ابتدا با استون و سپس متابول ۵ دقیقه  
سونیکه می‌گردد و سپس سطح سیلیکون با محلول پیرانا که  
شامل ۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه و ۷ میلی‌لیتر اسید  
سولفوریک است به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه  
سانتری‌گراد تمیز می‌گردد. به منظور بر طرف کردن لایه  
اسیدی از سطح سیلیکون به مدت ۲۰ دقیقه در مجاورت  
آمونیوم فلوراید ۴۰ درصد قرار می‌گیرد و در عین حال از گاز  
ارگون استفاده می‌شود تا از اکسید اسیون لایه مذکور  
جلوگیری گردد که در نهایت یک لایه اتم هیدروژن روی

تشییت پیتید حلقوی بر روی سطح سیلیکون عامل دار شده با ۱ و ۸ نانو دیان

آرزو پیتید تهیه شده در مرحله قبل سپس به وسیله واکنش با لایه ۱ و ۸ نانو دیان ایجاد شده بر روی سطح سیلیکون

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

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



شکل ۲. روش ثبت تک لایه ۱۰ نانومتری و پپتید حلقوی RGD بر روی سطح سیلیکون به روش شیمی کلیک

اتمسفر مرطوب با غلظت ۵٪ CO<sub>2</sub> کشت داده می‌شوند. سلول‌های فایبروبلاست از محیط کشت بهوسیله تریپسین ۲۵٪ به مدت ۵ دقیقه جدا شده و به پلیت‌های ۶ خانه حاوی سطح سیلیکون که با ۱۰ نانومتریان و RGD سیکلیک پپتید عامل‌دار شده‌اند اضافه می‌شود (۵، ۲۱).

### آزمون چسبندگی سلولی

در این آزمایش حدود ۱۰<sup>۵</sup> × ۵ سلول فایبروبلاست انسانی بر روی سطح سیلیکون ویفر که با RGD پپتید حلقوی عامل‌دار شده‌اند و ۱ و ۸ نانومتریان به عنوان سطح کنترل استفاده می‌شود. آزمون چسبندگی برای فواصل زمانی مختلف ۲۴، ۴۸ و ۴۸ ساعت ادامه دارد. 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 بهوسیله تریپسین جدا شده و تعداد سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری و هموسایتومتر شمارش می‌گردد. این آزمون سه بار تکرار می‌گردد (۵).

### آزمون فعالیت متابولیک سلولی

در این آزمایش کمابیش ۱۰<sup>۵</sup> × ۵ سلول به پلیت‌های ۲۴ خانه که حاوی ویفر سیلیکون عامل‌دار شده با آزیدو پپتید است و ۱ و ۸ نانومتریان به عنوان کنترل استفاده می‌شود. سلول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS در ۳۷ درجه در انکوباتور حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> 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 هیلیم امکان بهوسیله اسپکترومتر ESCALAB 220iXL مونوکروماتیک Al KR و یک ردیاب چند کاناله به دست آمدند. طیف‌ها در زاویه ۹۰ درجه و در فشار کمتر از ۱۰<sup>-۶</sup> پاسکال به دست آمد (۳۵).

### ATR-FTIR اسپکتروسکوپی

ATR-FTIR اسپکترومتر به عنوان روشی پر قدرت برای تعیین ساختار و شناسایی ترکیب‌های آلی، پیوندهای شیمیایی و شناسایی گروه‌های عاملی و ساختار مولکولی به کار می‌رود. طیف‌ها در دامنه طیفی ۴۰۰۰-۶۰۰ cm<sup>-۱</sup> و با پrecision ۴ cm<sup>-۱</sup> جمع آوری شدن (۲۵).

### کشت سلولی سلول‌های فیبروبلاست

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

به دست امده از سطح سیلیکون عامل دار شده با ۱ و ۸ نونادیان، و پیتید حلقوی RGD را نشان می دهد که وجود سیلیکون، کربن و اکسیژن را در سطح سیلیکون عامل دار شده با ۱ و ۸ نونادیان تأیید می نماید که مطابق با گزارش های مقالات دیگر است و نشان دهنده تثبیت با ۱ و ۸ نونادیان 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 پیتید حلقوی RGD به روش شیمی کلیک بر روی سطح سیلیکون، طیف XPS، وجود سیلیکون، کربن، اکسیژن و نیتروژن را تأیید می کند که نشان دهنده وجود پیتید بر روی سطح سیلیکون است (۲۳). طیف باریک Si2p کیفیت سطح و عدم وجود سیلیکون اکسید را در سطح سیلیکون عامل دار شده با ۱ و ۸ نونادیان و آزیدو پیتید به ترتیب نشان می دهد. در غیر این صورت یک پیک بین eV ۱۰۲ و ۱۰۴ دیده می شد (۲۴).

نسبت طیف کربن بعد از اتصال شیمیایی پیتید نسبت به طیف کربن در ۱ و ۸ نونادیان افزایش می باید که نشان دهنده افزایش مقدار کربن به واسطه پیتید روی سطح سیلیکون است (۲۰، ۲۵). طیف اسکن باریک کربن یک ساختار غنی را نشان می دهد 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 پیتید است. یک انرژی در ناحیه eV ۲۸۶ را می توان به گروه (C\N) پیتید نسبت داد (۲۰).

گروه (O\_C\N) یا (O\_O\_C) پیتید سبب ایجاد یک پیک در ناحیه eV ۲۸۸/۳ می شود. در ناحیه eV ۲۸۹ یک پیک است که در نتیجه حضور گروه O (O) N C اسپارتیک اسید است (۲۱، ۲۷).

هم چنین بعد از اتصال شیمیایی پیتید به سطح سیلیکون، یک نیتروژن به طیف XPS اضافه می شود که نشان دهنده وجود پیتید بر روی سطح سیلیکون است. این پیک در ناحیه eV ۴۰۰ مربوط به آمین های آزاد گروه است (۲۸). برای محاسبه غلظت پیتید بر روی سطوح، یکی از متدها اندازه گیری نسبت اتم نیتروژن به نسبت اتم کربن است که در این مطالعه نسبت N/C ۰/۲۷ به دست آمد. هم چنین بعد از اتصال شیمیایی آزیدو پیتید حلقوی به سطح سیلیکون،

زمان های مشخص شده (۲۴ و ۴۸) ساعت، ویفر سیلیکون ها با بافر PBS، سه بار شستشو می شوند و سپس در محیط کشتی که شامل٪ ۲۰ MTT است غوطه ور می گردند. واکنش به مدت یک ساعت انجام می شود و سپس جذب در ۴۹۰ نانومتر ثبت می گردد (۴، ۲۱).

### میکروسکوپ الکترونی روبشی

میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM برای بررسی مورفولوژی نمونه ها استفاده گردید. بعد از کشت سلول ها به مدت ۴۸ ساعت روی سطح سیلیکون عامل دار شده با پیتید و ۱ و ۸ نونادیان، سلول های فایبروبلاست چسبیده شده روی سطح سیلیکون با٪ ۲/۵ V/V گلوتارآلدئید برای مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه فیکس می شوند. سپس به منظور جدا کردن آب از نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه به ترتیب در اتانول ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ درصد خشک می شوند و بعد از خشک کردن کامل نمونه ها با طلا پوشیده می شوند (۲۱).

### میکروسکوپ روبشی هم کانون لیزری

میکروسکوپ لیزری هم کانون یا Nicon برای تعیین قابلیت زتده ماندن نمونه ها استفاده می گردد. یک دیود پالس limbo لیزری برای انجام فلورسنت میکروسکوپی در حالت PBS است. پروپیدیوم بداید و فلورسین دی استات در بافر برای ارزیابی زنده بودن سلول ها بعد از ۴۸ ساعت مورد استفاده قرار می گیرد. سلول های فلورسنس شده با قرمز به عنوان سلول های مرده و سلول های سبز به عنوان سلول های زنده هستند (۴).

### مطالعه های آماری

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

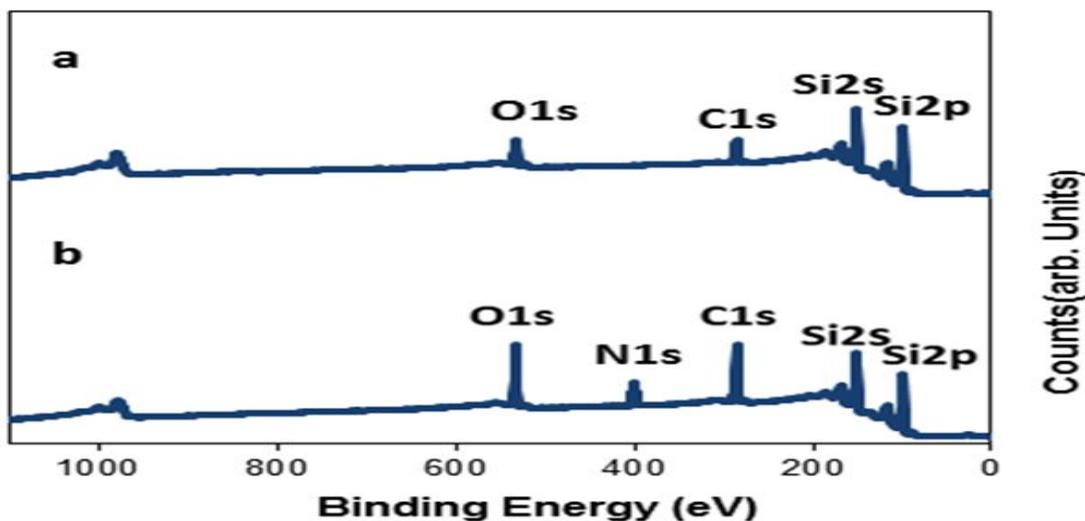
## نتایج

بررسی سطح سطوح سیلیکون عامل دار شده با آزیدو پیتید با XPS

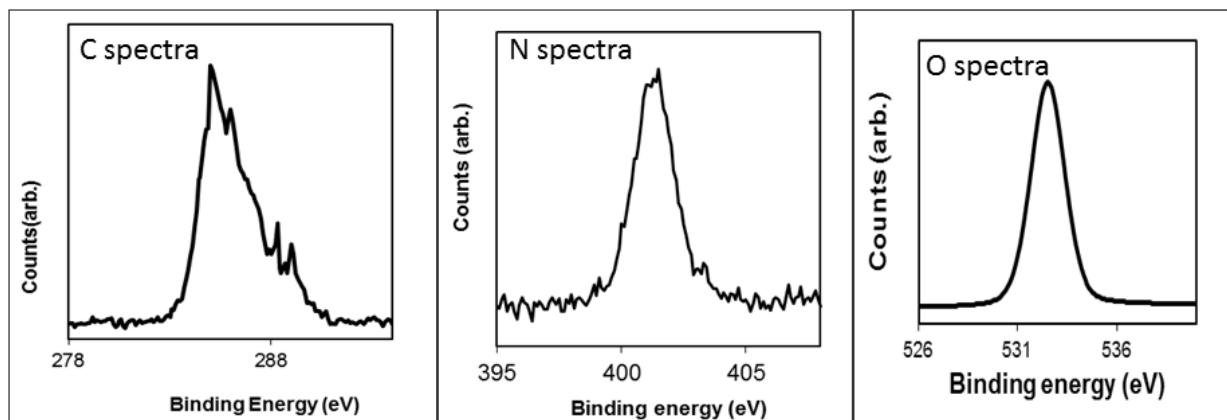
آنالیز XPS (طیف سنجی فتوالکترون اشعه ایکس) از روش های آنالیز سطحی برای بررسی سطح مواد از نقطه نظر آنالیز عنصری، ترکیب شیمیایی و تعیین حالت پیوندی است. تست XPS جزء روش های غیر مخرب محسوب می شود که آسیبی به نمونه وارد نمی کند. شکل ۳ نتایج طیف XPS

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  $\text{O}_\text{C}\text{N}$  پپتید است (۲۹). نتایج به دست آمده وجود پپتید را بر روی سطح سیلیکون تأیید می‌نماید. نتایج به-



شکل ۳. طیف XPS بر روی سطح (a) و نونادیان (b) را نشان می‌دهد.

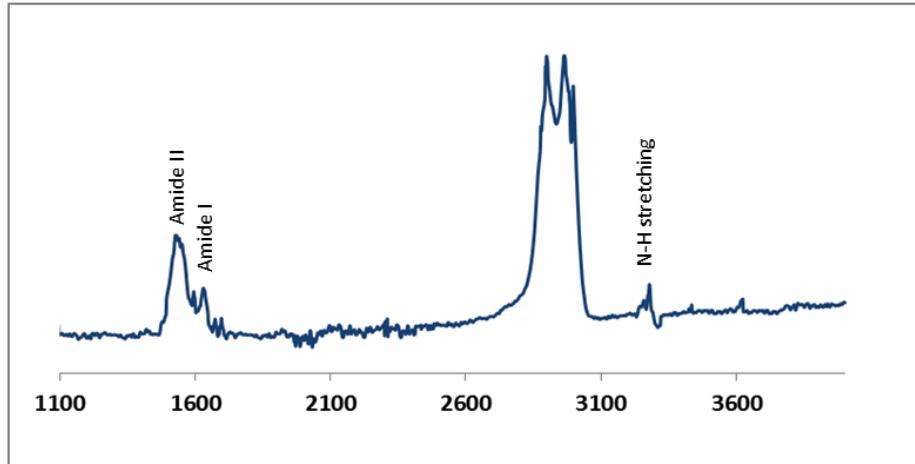


شکل ۴. طیف اسکن باریک XPS کربن، نیتروژن و اکسیژن را نشان می‌دهد.

است. باند آمید نوع II با شدت متوسط در ناحیه  $1550\text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود (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 آمید I و آمید II همپوشانی می‌کند و قادر نیست پیک مجزا ایجاد نماید (۳۱). این پیک‌ها نشان‌دهنده ثبت پپتید روی سطح سیلیکون است (۲۳).

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

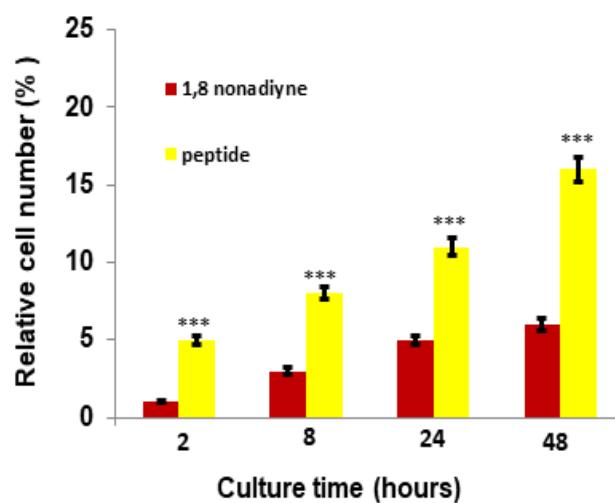
شکل ۵ نتایج حاصل از اینفرارد اسپکتروسکوپی-ATR-FTIR را نشان می‌دهد بعد از شیمی کلیک پپتید حلقی RGD، باند آمید I با شدت کم در ناحیه  $1630\text{ cm}^{-1}$  و یک پیک دیگر در حوالی  $3280\text{ cm}^{-1}$  که مربوط به باند آمیدی است نشان‌دهنده ساختار فضایی دوم پپتید به فرم صفحه بتا



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

سلول‌های چسبنده بر روی سطوح عامل‌دار شده با پپتید حلقوی در ۲ ساعت اول و کمابیش در تمام زمان‌های اندازه-گیری شده به طور 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 به صورت کوالانسی به سطوح متصل شده بود است.<sup>(۴)</sup>

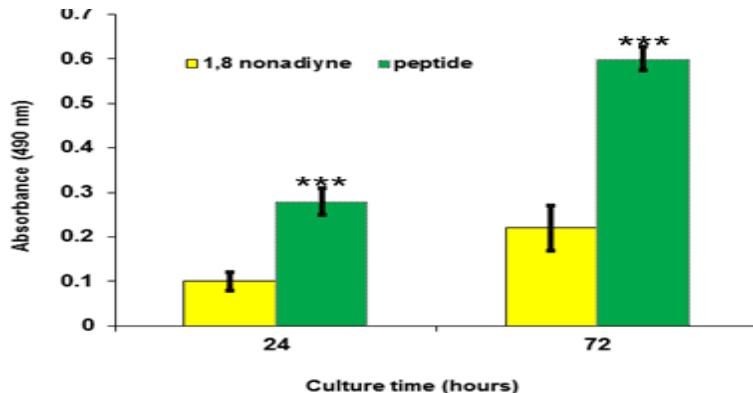
پاسخ سلول‌های فایبروبلاست انسانی به سطوح سلیکون عامل‌دار شده با پپتید حلقوی RGD سلول‌های فایبروبلاست انسانی بر روی ۱ و ۸ نونادیان و آزیدو پپتید در شرایط بدون سرم کشت داده شدند تا عملکرد آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. تعداد سلول‌های فایبروبلاست چسبیده به سطح ۱ و ۸ نونادیان و آزیدو پپتید بعد از (۲، ۸، ۲۴ 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 تعییه شده با پپتید بسیار محدودتر است. در واقع تعداد



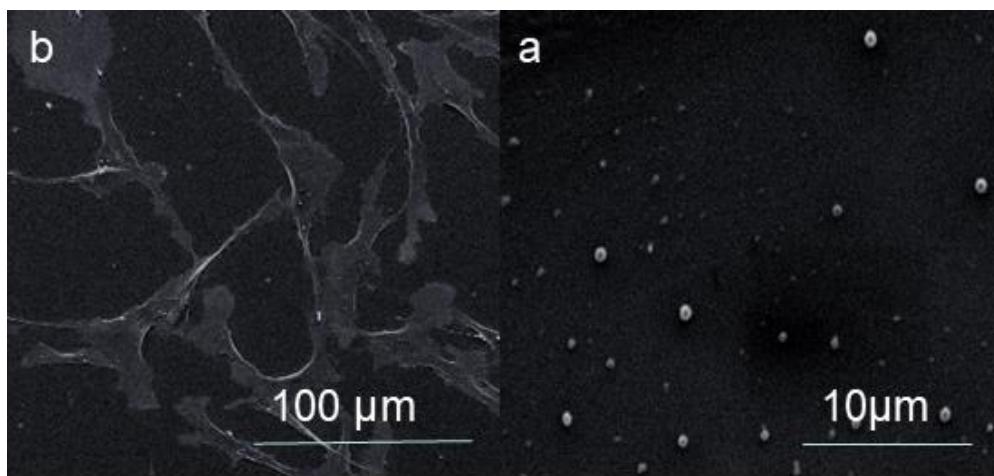
شکل ۶. چسبندگی سلول به ۱ و ۸ نونادیان و پپتید روی سطح سلیکون در دوره‌های زمانی متفاوت (۲، ۸، ۲۴ و ۴۸) ساعت نشان می‌دهد. هر تست سه بار تکرار شده است. نتایج هر تست بر اساس میانگین $\pm$  انحراف معیار بیان شده است. تعداد سلول‌های چسبیده به سطح پپتیدی در تمام مقطع زمانی به طور معنی‌داری بیشتر از سطح کنترل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

در مرحله بعد، مورفولوژی، چسبندگی و گسترش سلول های فایبروبلاست انسانی بر روی دو سطح پیتید حلقوی و سطح کنترل توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۸ مشاهده می گردد سلول های فایبروبلاست انسانی چسبیده بر روی سطوح عامل دار شده با پیتید حلقوی دارای دندریت های طولانی و گسترش یافته هستند و بدن سلول ها تماس نزدیکی با سطح پیتید دارند. در صورتی که بر روی سطح کنترل سلول ها درست نچسبیده اند و تعداد آن ها اندک و شکل دایره ای رشد نافatte 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 همچنان بیشتر از مطالعه‌های قبلی است که پپتید خطی RGD به صورت کوالانسی به سطوح متصل شده بودند است (۴).



شکل ۷. تعداد سلول های زنده روی سطح به ۱ و ۸ نونادیان و پیتید را بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان می دهد. نتایج هر تست بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده است. تعداد سلول های زنده روی سطح پیتیدی در تمام مقطع زمانی به طور معنی داری بیشتر از سطح کنترل (۱۰۰٪) است.

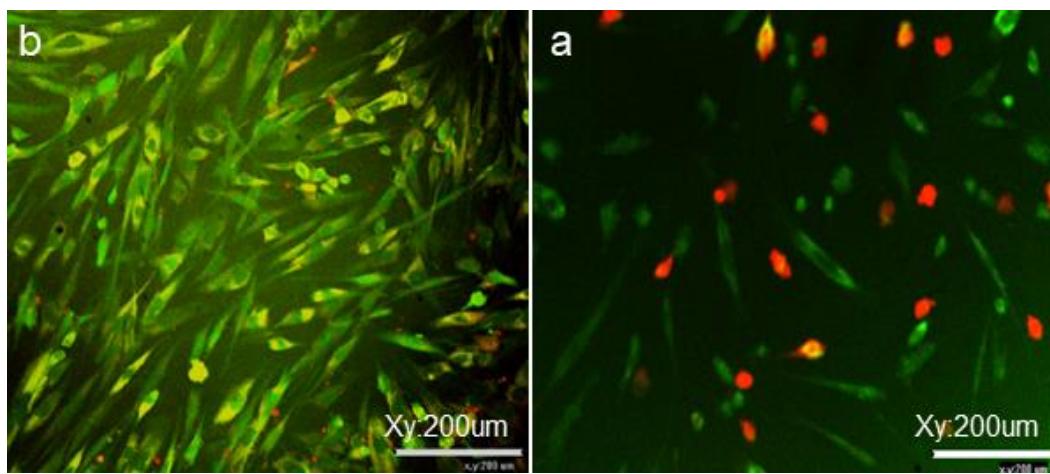


شکل ۸. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM را از سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطح ۱ و ۸ نونادیان (a) و پنطید (b) را بعد از ۴۸ ساعت نشان می‌دهد.

شده به طور یکنواختی بر روی سطح پیتید حلقوی توزیع گردیده‌اند. در صورتی که تعداد خیلی کمی از سلول‌های فیبروبلاست زنده و به طور غیر یکنواخت بر روی سطح کنترل دیده می‌شود. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعه-

تصاویر حاصل از کانفوکال میکروسکوپی هم کانون بر روی سطح پیتید حلقوی و سطوح کنترل بعد از ۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۹). سلول‌های فایروبلاست بعد از ۴۸ ساعت تعداد زیادی سلول زنده به صورت کشیده و طویل

RGD به طور قابل ملاحظه‌ای بهتر از سطوحی است که با پپتید خطی RGD عامل‌دار شده‌اند (۴).



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

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 کلیک ۰/۲۶ (۲۰) گزارش شده است. نظر به این که غلظت پپتید‌حلقوی RGD در این مطالعه و غلظت پپتید خطی RGD در مطالعه‌های قبلی روی سطح سیلیکون کمابیش مشابه است، ولی پاسخ سلولی بر روی پپتید حلقوی RGD بهتر از پپتید خطی RGD است که می‌تواند بهدلیل در دسترس بودن بهتر پپتید حلقوی RGD که سبب ارائه و عرضه بهتر لیگاند RGD به گیرنده‌های اینتگرین سلول‌ها می‌شود و در نهایت سبب افزایش پاسخ سلولی می‌شود. همان‌طور که در تحقیقات قبلی ذکر شده است لینکر نقش مهمی در دسترس قرار دادن سایت هدف به رسانه‌های اینتگرین دارد (۵). در مقاله‌های 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 گلایسین است به عنوان لینکر استفاده می‌شود، از طرف دیگر غلظت پپتید حلقوی در این مقاله کمابیش با غلظت پپتید خطی در مطالعه‌های قبلی مشابه است ولی پاسخ سلولی در این تحقیق که شامل چسبندگی سلولی، تکثیر، مورفولوژی و تعداد سلول‌های زنده بیش‌تر از سطوحی است که با پپتید خطی RGD پوشیده شده‌اند. این نتایج هم‌چنین نشان‌دهنده حفظ فعالیت

## بحث

به منظور بررسی اثر سلول‌های فایبروبلاست انسانی بر روی پپتید حلقوی RGD، ابتدا لایه منومری ۱، ۸ نونادیان بر روی سطح سیلیکون ایجاد گردید و سپس آزیدو پپتید حلقوی بر روی لایه مذکور به طور شیمی کلیک ثابت شد. نتایج آزمایش‌های FTIR و XPS وجود پپتید را بر روی سطح سیلیکون تأیید نمود. سپس مورفولوژی، چسبندگی سلولی، توانایی زنده ماندن و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بر روی سطح پپتید 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) ازدی عمل سوبسترا و لیگاند برای اتصال به هم‌دیگر کنترل می‌گردد.

نتایج پاسخ سلول‌های فایبروبلاست انسانی به سطوح سیلیکون عامل‌دار شده با پپتید حلقوی نشان داد که پاسخ سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطوح عامل‌دار شده با پپتید حلقوی RGD به طرز چشم‌گیری بیش‌تر از سطوح کنترل است. یکی از عامل‌های 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 می‌رود (۳۲). نتیجه مطالعه‌های قبلی یک ارتباط مستقیم بین غلظت پپتید روی سطح و

تری جهت تأیید این کارایی بیولوژیکی این سطوح ضروری است.

### نتیجه‌گیری

پیتید حلوی حاوی سکانس RGD با ۴- آزیدو فنل ایزوتیوسیانات به طور اختصاصی واکنش می‌دهد و آزیدو پیتید ایجاد می‌کند که به طور اختصاصی با گروه استیلن روی سطح سیلیکون واکنش می‌دهد و سبب ثبت شیمیایی پیتید بر روی سطح سیلیکون می‌گردد. آزمایش-های XPS و ATR-FTIR وجود پیتید را بر روی سطح سیلیکون تأیید نمودند. آزمایش‌های کشت سلولی نشان داد که پیتید ثبت شده بر روی سطح سیلیکون باعث افزایش قابل ملاحظه پاسخ سلولی که شامل (مورفولوژی، چسبندگی، تکثیر و زنده ماندن سلول‌های فیبروبلاست) نسبت به سطح کنترل می‌گردد. اگرچه آزمایش‌های تأیید می‌کند که این سطوح زیست سازگار هستند ولی آزمایش‌های بیشتری نیاز است به منظور این که کارایی آن‌ها در کاربردهای پزشکی و تشخیصی تأیید گردد.

### سپاسگزاری

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

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

افزایش پاسخ سلولی بر روی سطوحی که با RGD حلقوی پوشیده شده‌اند ممکن است به علت انعطاف‌پذیری و در دسترس بودن بهتر RGD حلقوی نسبت به RGD خطی است (۳۶). تغییرهای ساختاری و جهت‌گیری اسیدهای آمینه در ساختار پیتید نقش اساسی را در شناسایی رسپتورها اعمال می‌کند (۳۷). مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که RGD پیتید حلقوی افینیتی بیشتری برای اتصال به رسپتورهای اینتگرین در مقایسه با RGD خطی دارد که باعث می‌گردد رسپتورهای اینتگرین به طور مؤثرتری به RGD حلقوی متصل گردند. از طرف دیگر قابل انعطاف بودن ساختار سه بعدی پیتید RGD خطی آن را غیرپایدار می‌سازد، در صورتی که ساختار سه بعدی RGD حلقوی باعث پایداری ساختار پیتید می‌گردد و سبب می‌گردد اتصال آن به اینتگرین مؤثرتر از پیتید RGD خطی گردد (۳۸,۳۹).

کاهش پاسخ سلولی پیتید RGD خطی ممکن است به علت در دسترس قرار نگرفتن مناسب لیگاند به‌وسیله رسپتور باشد که باعث کاهش اتصال‌های مؤثر بین لیگاند و رسپتور می‌گردد. محدودیت تعداد باندهای مؤثر در RGD خطی باعث کاهش چسبندگی سلول به سطوح می‌گردد که این امر مانع گسترش سلول‌های چسبیده بر روی سطح می‌گردد (۴۰). هم‌چنین در بعضی تکنیک‌های ثبت کننده پیتید به طریق شیمیایی، تغییر قابل توجه در ساختار فضایی اینتگرین رخ می‌دهد که به طور قابل ملاحظه‌ای سبب کاهش افینیتی بین رسپتور و لیگاند می‌گردد. بنابراین قسمت کمی از پیتید جذب شده روی سطح از نظر ساختار فضایی برای رسپتورهای چسبندگی سلولی در دسترس است که باعث کاهش پاسخ سلولی می‌گردد. گسترش سلول‌ها بر روی سطح عامل دار شده به تعداد و توزیع سایت‌های اتصال پیتید و قابلیت دسترسی بودن آن‌ها بستگی دارد (۴۱,۴۲). بنابراین گسترش سلول‌های فیبروبلاست بر روی سطوح پیتید حلقوی ممکن است تعداد بیشتری از لیگاندها بر روی پیتید با رسپتورهای سلولی متصل شوند که نیروی کششی و پشتیبانی مکانیکی لازم جهت گسترش ساختار سلولی را فراهم می‌کنند (۳۴). اگرچه این نتایج روش بهینه‌ای برای اتصال پیتیدهای بیولوژیک و حلقوی را بازده بالا بر روی سطوح عامل دار شده نشان می‌دهد، ولی آزمایش‌های 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 NH<sub>2</sub>-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 Fuad 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 Br<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, 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, Caravetta 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, Koksch 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 TiO<sub>2</sub> 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.

