

Polymerization
Quarterly, 2015
Volume 5, Number 2
Pages 16-26
ISSN: 2252-0449

Surface Modification of Magnetite Nanoparticles via “Click” Reaction for Biomedical Applications

Sepideh Khoee and Yousef Bagheri

Polymer Chemistry Group, Department of Chemistry, Faculty of Science, Tehran University, P.O. Box: 14155-6455, Tehran, Iran

Received: 18 August 2014, Accepted: 6 October 2014

Abstract

During the last decades, great efforts have been devoted to designing polymers to avoid toxicity, increasing the absorption, and improving drug release profiles. Magnetic nanoparticles (MNPs) have found various important applications in nanotechnology and nanomedicine in the areas of diagnosis, targeting and therapy. In these applications, MNPs surfaces must be tailored to improve biocompatibility and reduce aggregation. Since the introduction of "click concept" by Sharpless and coworkers in 2001, numerous examples of click reactions have been reported for the preparation and functionalization of polymeric micelles and nanoparticles, liposomes and polymersomes, capsules, microspheres, metal and silica nanoparticles, carbon nanotubes and fullerenes, or bionanoparticles. Among all the chemical reactions adopted in modification of magnetic nanoparticles, click chemistry with its unique features such as high aqueous competency, chemical orthogonality, and applicability toward diverse substrates has emerged as a burgeoning strategy for the development of surface-engineered polymers and nanoparticles with high selectivity and efficiency.

Keywords

click reaction,
magnetite nanoparticles,
surface modification,
drug delivery,
bioapplications

(*) To whom correspondence should be addressed.
E-mail: khoe@khayam.ut.ac.ir

اصلاح سطح نانوذرات مگنتیت با واکنش کلیک و استفاده از آنها در کاربردهای زیست‌پزشکی

سپیده خوئی*، یوسف باقری

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده شیمی، گروه شیمی پلیمر، صندوق پستی ۶۴۵۵-۱۴۱۵۵

دریافت: ۱۳۹۳/۵/۲۷، پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۱۴

در دهه‌های اخیر، تلاش‌های گسترده در طراحی پلیمرها برای کاهش سمیت، افزایش جذب و بهبود الگوی رهایش داروها انجام گرفته است. نانوذرات آهن در کنار سایر سامانه‌های نوین پزشکی از گزینه‌های مورد توجه برای کاربردهای دارورسانی، شناسایی، هدفمندسازی و درمان است. برای اینکه نانوذرات مزبور در این موارد قابل استفاده باشند، لازم است که سطح آنها برای افزایش پایداری و زیست‌سازگاری، اصلاح شود. از سال ۲۰۰۱ که شارپلس و همکاران واژه کلیک را معرفی کردند، گزارش‌های بسیاری برای تهیه یا عامل‌دار کردن میسل‌ها و نانوذرات پلیمری، لیپوزوم‌ها، پلیمرزوم‌ها، کپسول‌ها، میکروذرات، نانوذرات فلزی و سیلیکا، نانولوله‌های کربنی، فولرن‌ها و نانوذرات زیستی بر پایه این واکنش ارائه شد. در بین تمام واکنش‌هایی که برای اصلاح سطح نانوذرات آهن استفاده می‌شود، واکنش کلیک به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر سرعت زیاد واکنش، عدم تاثیر از محیط واکنش، اختصاصی بودن، زیست‌سازگاری، انجام شدن در دمای محیط و عدم تاثیر از ممانعت فضایی، بیشتر مورد توجه است. از این واکنش برای اتصال مولکول‌های کوچک، پلیمرها و مولکول‌های زیستی روی سطح نانوذرات استفاده می‌شود.

بسپارش
فصلنامه علمی-ترویجی
سال پنجم، شماره ۲
صفحه ۲۶-۱۶، ۱۳۹۴
ISSN: 2252-0449

چکیده



سپیده خوئی



یوسف باقری

واژگان کلیدی

واکنش کلیک،
نانوذرات مگنتیت،
اصلاح سطح،
دارورسانی،
کاربردهای زیستی

مقدمه

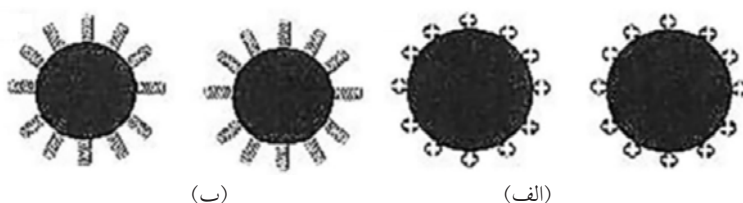
در حال حاضر با توجه به خیل عظیم داروهای ژنتیکی و سنتزی، استفاده از سامانه‌های نوین دارورسانی کنترل شده بر پایه حامل‌های پلیمری هدفمند، که هم مقدار مصرف دارو و هم عوارض جانبی آن را کاهش می‌دهند، موضوع مورد توجه بسیاری از پژوهش‌ها در زمینه داروسازی و دارورسانی است. در بین تمام گزینه‌های در دسترس برای دارورسانی و تشخیص، نانوذرات آهن به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردی که دارند، مورد توجه ویژه هستند. ویژگی‌هایی نظیر مغناطیسی شدن زیاد، توزیع اندازه یکنواخت و پراکندگی اندازه باریک (که این ویژگی باعث کمتر شدن اتلاف نانوذرات در بدن می‌شود)، هدفمندی فعال و فیزیکی، پایداری و زیست‌سازگاری باعث محبوبیت این ذرات می‌شوند [۳-۱]. نانوذرات ابرپارامغناطیس آهن کاربردهای گسترده‌ای در زمینه زیستی به عنوان مواد حاجب (magnetic resonance imaging, MRI)، سم‌زدایی (detoxification) از سیالات زیستی، ترمیم بافت، گرمادرمانی (hyperthermia)، دارورسانی، جداسازی سلولی و آزمون‌های ایمنی‌شناسی دارند [۳، ۴]. با این حال، لازم است تا برای استفاده موفق از نانوذرات آهن در این زمینه، سطح آنها اصلاح شود. اصلاح سطح نانوذرات برای دستیابی به جریان کلئیدی پایداری از نانوذرات در برابر تجمع در محیط زیستی و در میدان مغناطیسی لازم است [۵]. سطح نانوذرات آهن مثل اسید لوئیس عمل می‌کند و با مولکول‌هایی که جفت الکترون آزاد دارند، کوئوردینانس می‌شود. در محیط آبی، اتم‌های آهن با مولکول‌های آب کوئوردینانس شده و سطح نانوذرات آهن دارای گروه عاملی OH می‌شود. با توجه به این که گروه عاملی الکی آفوتر است، با تغییر pH محیط، بار سطح نانوذرات آهن هم تغییر پیدا می‌کند. در pH کمتر از ۶/۸، سطح نانوذرات مثبت و در بیش از آن، سطح نانوذرات منفی می‌شود. در pH حدود ۶/۸ بار سطح نانوذرات بسیار کوچک می‌شود. در نتیجه، پایداری آنها کم و تمایل برای تجمع در آنها بیشتر می‌شود [۴]. پایداری نانوذرات

مغناطیسی نتیجه تعادل بین نیروهای دافعه و جاذبه بین آنهاست. به لحاظ نظری بین نانوذرات مغناطیسی، چهار نوع نیروی جاذبه و دافعه وجود دارد که عبارتند از:

- نیروهای واندروالس، که جاذبه همسانگرد قوی با دامنه کوتاه بین نانوذرات را باعث می‌شود،
 - نیروی دافعه الکتروستاتیک بین نانوذرات،
 - نیروی دوقطبی مغناطیسی که جاذبه ناهمسانگرد را در پی دارد
 - دافعه‌ای که به دلیل آثار فضایی وجود دارد [۴].
- پایدارسازی نانوذرات را می‌توان با دست‌کاری هریک از این نیروهای دافعه و تقویت آنها انجام داد. در پایدارسازی نانوذرات، کنترل قدرت هریک از این نیروها پارامتر بسیار مهمی است. تعیین مقدار اثر دافعه فضایی دشوار است. ولی برای پلیمرها به خوبی نتیجه‌گیری شده است که بزرگی دافعه فضایی بستگی به جرم مولکولی پلیمر و چگالی آن دارد. دافعه الکتروستاتیک، با دنبال کردن پتانسیل نفوذ که بسیار به پتانسیل زتا نزدیک است، معین می‌شود که بستگی به قدرت یونی محیط و pH محلول دارد [۶-۱۰]. در شکل ۱ نمایی از پایدار شدن نانوذرات آمده است. برای پایدارسازی نانوذرات آهن معمولاً از پایدارکننده‌های مونومری، مواد معدنی و پلیمرها استفاده می‌شود که در ادامه به اختصار شرح داده می‌شوند.

پایدارکننده‌های مونومری

ترکیباتی با گروه‌های عاملی مثل کربوکسیلات، فسفات و سولفات به سطح نانوذرات مغناطیسی متصل می‌شوند و باعث پایداری نانوذرات می‌شوند. بسته به آبدوست یا آبگریز بودن مولکول‌های پوشاننده سطح، نانوذرات در محیط آبی یا محیط آلی پراکنده شده و پایدار می‌شوند. به عنوان مثال، با اتصال اولئیک اسید (مولکول آبگریز) به سطح نانوذرات، آنها در محیط آلی قابل پراکنش می‌شوند [۱۱]. اولئیک اسید با گروه کربوکسیل خود به سطح نانوذره متصل می‌شود و انتهای آبگریز آن در محیط قرار می‌گیرد و به نانوذرات قابلیت پراکنش در محیط آلی را



شکل ۱- (الف) نانوذرات پایدار شده با برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و (ب) نانوذرات پایدار شده با دافعه فضایی [۴].

دیگر پوشش پلیمری را روی آنها می‌نشانند (ماده سطح فعال پلیمری). پوشش‌های پلیمری علاوه بر اینکه باعث افزایش پایداری نانوذرات می‌شوند و از تجمع آنها جلوگیری می‌کنند، با توجه به ویژگی‌هایی که دارند می‌توانند به عنوان جایگاهی برای بارگذاری دارو هم استفاده شوند [۱۷، ۱۸]. با تغییر نوع و ویژگی پلیمرهایی که به عنوان پوشش استفاده می‌شوند، می‌توان ویژگی‌های نانوذرات حاصل را تغییر داد. برای مثال، پوشش یک پلیمر آبدوست روی سطح نانوذرات باعث آبدوست شدن سطح آنها و پراکنش نانوذرات در محیط‌های آبی می‌شود. نانوذرات پوشش یافته با پلیمر نسبت به سایر پوشش‌ها این مزیت را دارند که می‌توان داروهای مورد نظر را بر اساس نوع و خواص پلیمرها به طور فیزیکی درون آنها بارگذاری کرد. با توجه به اینکه اتصال دارو به سطح نانوذرات با استفاده از پیوند شیمیایی معایی از جمله امکان از دست رفتن خاصیت دارو، عدم رهایش کامل و رهایش دیر هنگام آن را در پی دارد، تمایل برای بارگذاری دارو به طور فیزیکی درون نانوذرات بیشتر شده است.

نانوذرات پوشش یافته با پلیمرهای آبدوست به عنوان حامل داروهای آبدوست می‌توانند استفاده شوند. اما چون اکثر داروها آبگریزند، پس نیاز به محیطی آبگریز برای بارگذاری دارند. ولی نانوذرات پوشش یافته با پلیمرهای آبگریز به سرعت به وسیله سامانه دفاعی بدن شناسایی و دفع می‌شوند. برای این که نانوذرات هم ویژگی بارگذاری دارو را داشته باشد و هم به وسیله سامانه دفاعی بدن شناسایی نشوند، نانوذرات را با پلیمرهای دوگانه‌دوست پوشش می‌دهند. در این حالت، بخش آبگریز داخلی به عنوان محلی برای وارد شدن داروی آبگریز است و بخش بیرونی آبدوست ویژگی مخفی بودن را به سامانه می‌دهد. از طرف دیگر، اتصال پلیمرها روی سطح نانوذرات به یکی از دو روش پیوند خوردگی از یا پیوند خوردگی به سطح، انجام می‌شود تا ویژگی‌های مورد انتظار از نانوذرات را به دست دهد. در روش پیوند خوردگی از سطح، واکنش پلیمر شدن از روی سطح نانوذره آغاز می‌شود و واکنش ادامه پیدا می‌کند. مزیت روش مزبور این است که چون رشد زنجیرهای پلیمری از روی نانوذرات جدا شروع می‌شود، امکان تشکیل خوشه پلیمر، خیلی کمتر است. روش پیوند خوردگی به سطح، بیانگر متصل کردن پلیمرهای از پیش سنتز شده به روی سطح نانوذرات آهن با استفاده از برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک، آبگریز یا بر اساس تمایل ذاتی برخی از گروه‌های شیمیایی است. در این روش مشکل این است که اتصال پلیمر روی سطح نانوذرات کوچک آهن ممکن است

می‌دهد. پوشش سیتریک اسید (مولکول آبدوست) روی ذرات به آنها قابلیت پراکنش در محیط آبی را می‌دهد. اتصال سیتریک اسید روی سطح نانوذرات بسته به انحای سطح و آثار فضایی با کوئوردینانس شدن یک یا دو گروه کربوکسیل روی سطح نانوذرات انجام می‌گیرد. گروه کربوکسیل آزاد باقی‌مانده روی سطح نانوذرات به آنها بار منفی و خصلت آبدوستی می‌دهد [۱۲].

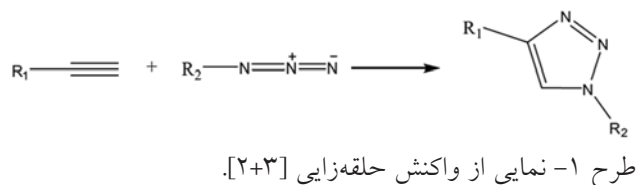
مواد معدنی

برای پایدار کردن نانوذرات با استفاده از پوشش معدنی، آنها را با سیلیکا، طلا یا گادولیم (III) پوشش می‌دهند [۱۵-۱۳]. این پوشش‌های معدنی علاوه بر اینکه باعث پایداری نانوذرات در محلول می‌شوند، به اتصال لیگاندهای زیستی متنوعی هم به سطح نانوذرات کمک می‌کنند. برای مثال چون گوگرد به سطح طلا به خوبی متصل می‌شود، اگر هدف اتصال ترکیب گوگردار به سطح نانوذرات مغناطیسی باشد، یک راه این است که پوششی از طلا روی نانوذرات آهن داده شود. در نتیجه، نانوذرات حاصل دارای هسته آهنی و پوسته فلزی از مواد معدنی هستند.

در بین سایر مواد معدنی، سیلیسیم مورد توجه زیادی قرار گرفته است. پوشش بی‌اثر سیلیسیم روی سطح نانوذرات مغناطیسی از تجمع آنها در محلول جلوگیری می‌کند، پایداری شیمیایی نانوذرات را افزایش داده و محافظت از آنها را در برابر سمیت افزایش می‌دهد. پوشش سیلیکا از دو جهت باعث افزایش پایداری نانوذرات می‌شود. این لایه جاذبه دوقطبی بین نانوذرات را پوشش می‌دهد و تمایل برای تجمع آنها را کمتر می‌کند. از طرف دیگر، نانوذرات سیلیکا حامل بار منفی هستند، بنابراین پوشش سیلیکا دافعه کولمبی بین نانوذرات را افزایش می‌دهد و از تجمع آنها جلوگیری می‌کند. در واقع این پوشش هم جاذبه بین نانوذرات را کمتر و هم دافعه بین آنها را بیشتر می‌کند [۱۶].

پلیمرها

پلیمرها هم در کنار پایدارکننده‌های کوچک مولکول و مواد معدنی به عنوان پوششی برای اصلاح سطح نانوذرات آهن مطرح‌اند. برای پوشش دادن سطح نانوذرات معمولاً از دو راهبرد استفاده می‌کنند. اول اینکه پوشش پلیمری را هم‌زمان با ساخت نانوذرات روی آنها پوشش می‌دهند. به عنوان مثال، گروه جوزفسون (Josephson) روش رسوب دادن هم‌زمان را در مجاورت دکستران انجام دادند و نانوذرات پوشش یافته با آن را طی یک مرحله سنتز کردند [۴]. در روش دوم، پس از سنتز نانوذرات، طی یک مرحله

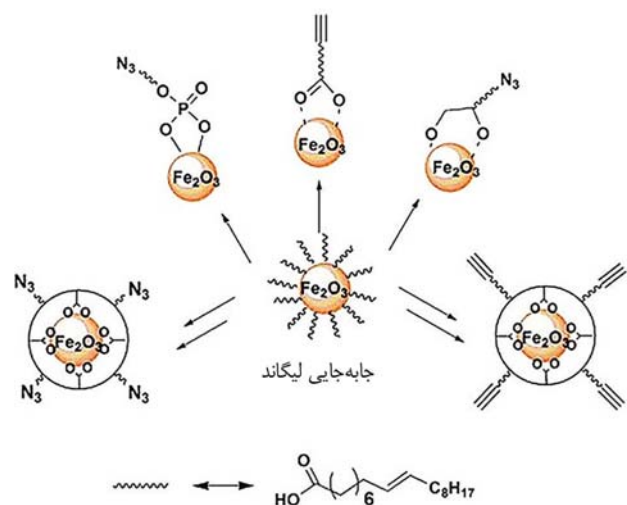


تعویض لیگاند

در این روش، از ویژگی تمایل زیاد گروه‌های کربوکسیل، دی‌ال‌ها و فسفونات‌ها برای اتصال به سطح نانوذرات آهن استفاده می‌شود. اولتیک اسید اولیه، که در طول سنتز نانوذرات یا پس از آن روی نانوذرات پوشش داده می‌شود، طی یک مرحله اضافه‌تر با لیگاندهایی که پتانسیل واکنش کلیک دارند، جایگزین می‌شود. در شکل ۲ این روش آورده شده است.

آبکافت در جای آهن (III)-۳-آلیل استیل استونات (IAA)

در این روش، نانوذرات آهن از آبکافت کمپلکس آهن (III) استیل استونات (Fe(acac)₃) در مجاورت هیدرازین به عنوان عامل کاهنده سنتز می‌شوند. نانوذرات به دست آمده روی سطح خود گروه‌های عاملی پیوند دوگانه دارند. از این پیوندهای خود دوگانه به دو روش استفاده می‌شود، یا آنها را وارد واکنش کلیک با تیول می‌کنند یا اینکه با انجام یک مرحله واکنش اضافه‌تر، گروه‌های آزید یا آلکین ایجاد شده روی آنها وارد واکنش حلقه‌زایی [۲+۳] می‌شوند. به عنوان مثال، در طرح ۲-الف پس از سنتز نانوذرات حامل پیوند دوگانه، آنها را در مجاورت آغازگر رادیکالی AIBN با تیول آمینواسید سیستین وارد واکنش می‌کنند و آمینواسید به سطح نانوذره متصل می‌شود [۲۰].

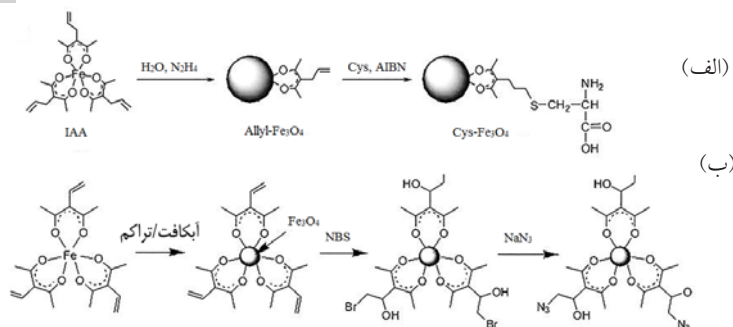


شکل ۲- وارد کردن گروه‌های با پتانسیل واکنش کلیک به روش تغییر لیگاند روی سطح نانوذرات آهن [۲۰].

به تعدادی از برهم‌کنش‌ها منجر شود. بدین ترتیب، پلیمرها فقط به یک نانوذره متصل نمی‌شوند، بلکه به مجموعه‌ای از نانوذرات متصل شده و یک خوشه ساخته می‌شود. برای جلوگیری از وقوع این مشکل ضروری است از واکنش‌های شیمیایی استفاده شود که کاملاً گزینشی عمل می‌کنند.

برای اصلاح سطح نانوذرات آهن با پلیمرها یا در برخی موارد به‌وسیله گونه‌های شناسایی کننده یا تعدادی از داروها، انواع روش‌های شیمیایی پیشنهاد شده است. در سال‌های اخیر، واکنش‌های موسوم به واکنش کلیک به عنوان یک روش با پتانسیل زیاد در حال بازکردن جای خود در میان این روش‌هاست. مفهوم کلیک به مجموعه‌ای از واکنش‌های پرسرعت اشاره دارد که محصولات جانبی تولید نمی‌کنند، حساسیتی به محیط واکنش ندارند، بسیار اختصاصی عمل می‌کنند، شرایط واکنش بسیار ملایمی دارند و حساسیتی به ممانعت‌های فضایی در برابر واکنش ندارند. مفهوم کلیک اشاره به طیفی از واکنش‌ها اعم از واکنش باز شدن هسته‌دوستی حلقه‌های اپوکسی و آزیردین، واکنش تیول‌ها با پیوند دوگانه، واکنش‌های غیرآلدولی کربونیل‌ها، دیلز آلدو و حلقه‌زایی [۲+۳] دارد. واکنش حلقه‌زایی [۲+۳] اولین بار توسط گروه شارپلس (Sharples) در سال ۲۰۰۱ مطرح شد. این واکنش به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد، به سرعت جایگاه خود را در بسیاری از شاخه‌های شیمی پیدا کرد. واکنش مزبور در مجاورت کاتالیزورهای بر پایه مس و روتینیم به خوبی انجام می‌شود. طرح ۱ نمایی از این واکنش را نشان می‌دهد [۱۹]. این واکنش با سرعت مناسب در دمای محیط با بهره زیاد و بدون حساسیت به وجود اکسیژن و در مجاورت انواع حلال‌ها به خوبی انجام می‌شود. از این رو، طی چند سال اخیر استفاده از این واکنش برای اصلاح سطح نانوذرات توجه شایانی به خود جلب کرده است. از مهم‌ترین موانع در برابر واکنش روی سطح نانوذرات (یا هر سطح دیگر)، ممانعت فضایی در برابر ورود واکنش‌دهنده‌ها به محیط واکنش است، به‌ویژه به دلیل بزرگ بودن پلیمر و نانوذرات آهن در مواردی که پلیمر را روی سطح نانوذره پوشش می‌دهند. ولی، حساسیت واکنش حلقه‌زایی [۲+۳] به اندازه واکنش‌دهنده‌ها نیست و به خوبی تحت این شرایط منجر به تولید محصول می‌شود. برای انجام واکنش کلیک روی نانوذرات آهن لازم است که گروه‌های آزید یا آلکین روی این نانوذرات و گونه‌ای که قرار است روی نانوذره بچسبد، قرار داده شود. برای قرار دادن گروه آزید یا آلکین روی سطح نانوذرات معمولاً از سه روش زیر یکی انتخاب می‌شود.





طرح ۲- واکنش کلیک روی نانوذرات حامل پیوند دوگانه: (الف) واکنش کلیک پیوند دوگانه در مجاورت آغازگر AIBN با تیول [۲۰]، (ب) واکنش پیوند دوگانه با N-برموسوکسینیمید و قرارگیری برم روی نانوذره که با واکنش هسته دوستی با آزید جایگزین شده و در ادامه واکنش حلقه‌زایی [۲+۳] انجام می‌شود [۲۱].

در طرح ۲-ب، از واکنش پیوند دوگانه با N-برموسوکسینیمید، برم به پیوند دوگانه اضافه شده و در ادامه طی یک واکنش جایگزینی هسته‌دوستی با سدیم آزید، نانوذرات حامل آزید سنتز می‌شوند که برای مراحل بعدی واکنش استفاده می‌شوند [۲۱].

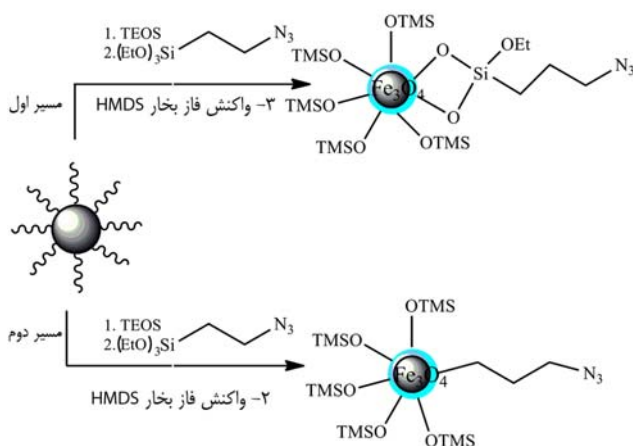
خواص نانوذرات ساخته شده نیز اثرگذارند، به طوری که درصد آزید روی سطح و همچنین ضخامت لایه سیلانی که روی سطح قرار می‌گیرد، در این دو روش متفاوت است. درصد آزیددار شدن سطح در روش دوم نسبت به روش اول بیشتر است [۲۲].

واکنش کلیک برای اتصال مولکول‌های کوچک، پلیمرها و مولکول‌های زیستی مثل پروتئین‌ها و پادتن‌ها استفاده شده است. پس از اینکه گروه‌های با پتانسیل انجام واکنش کلیک روی سطح نانوذرات ایجاد می‌شوند، واکنش کلیک [۲+۳] انجام شده و نانوذرات مورد نظر به دست می‌آیند. گروه کانگ (Kang) با استفاده از واکنش کلیک [۲+۳] درختواره‌های پلی(استرآمین) از نسل سوم را با آغاز پلیمر شدن از سطح نانوذرات آهن ساختند. نانوذرات اصلاح شده با این درختواره‌ها، به دلیل دارا بودن حلقه‌های تری‌آزول در ساختار خود و آمین‌های نوع سوم موجود روی آنها، به pH حساس‌اند. با کاهش pH اندازه هیدرودینامیکی

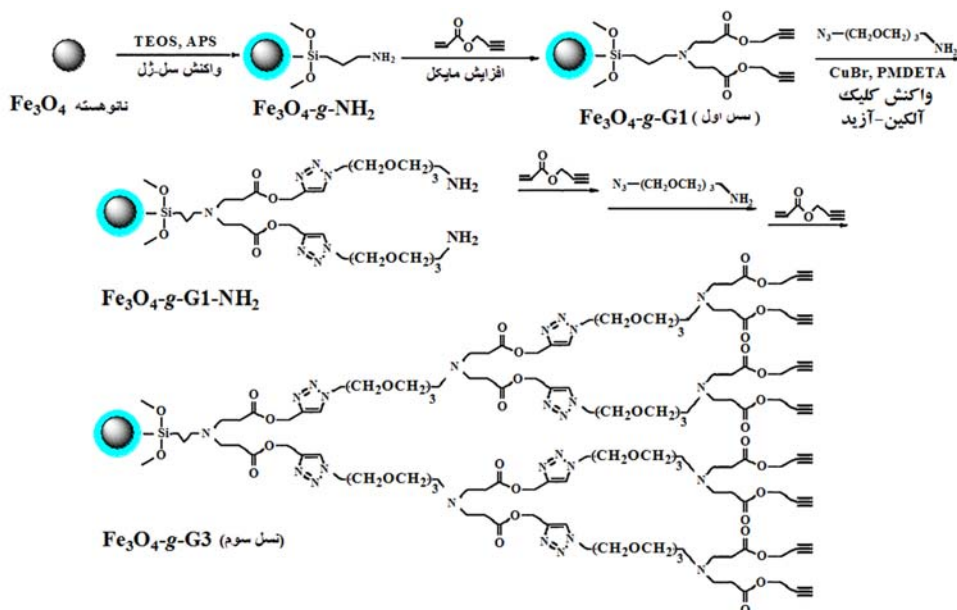
در این روش یک لایه از سیلیکا روی سطح نانوذرات پوشش داده می‌شود. این لایه اکسید سیلیسیم حامل گروه آزید یا آلکین یا گروه با پتانسیل تبدیل به این گروه‌هاست که زمینه واکنش بعدی را روی نانوذرات فراهم می‌کند. در طرح ۳، دو روش پوشش‌دهی سطح نانوذرات و عامل‌دار کردن آنها آورده شده است. در مسیر اول، ابتدا پوشش‌دهی انجام می‌شود و در ادامه آزیددار شدن انجام می‌گیرد. ولی در روش دوم، هم پوشش‌دهی و هم عامل‌دار کردن نانوذرات طی یک مرحله انجام می‌شود. این دو روش بر

سیلان‌دار کردن سطح نانوذرات

در این روش یک لایه از سیلیکا روی سطح نانوذرات پوشش داده می‌شود. این لایه اکسید سیلیسیم حامل گروه آزید یا آلکین یا گروه با پتانسیل تبدیل به این گروه‌هاست که زمینه واکنش بعدی را روی نانوذرات فراهم می‌کند. در طرح ۳، دو روش پوشش‌دهی سطح نانوذرات و عامل‌دار کردن آنها آورده شده است. در مسیر اول، ابتدا پوشش‌دهی انجام می‌شود و در ادامه آزیددار شدن انجام می‌گیرد. ولی در روش دوم، هم پوشش‌دهی و هم عامل‌دار کردن نانوذرات طی یک مرحله انجام می‌شود. این دو روش بر



طرح ۳- پوشش‌دهی سطح و آزیددار کردن سطح نانوذرات آهن برای واکنش کلیک [۲۲].



طرح ۴- سنتز نسل سوم از پلی(استر آمین) با استفاده از واکنش کلیک [۲۳].

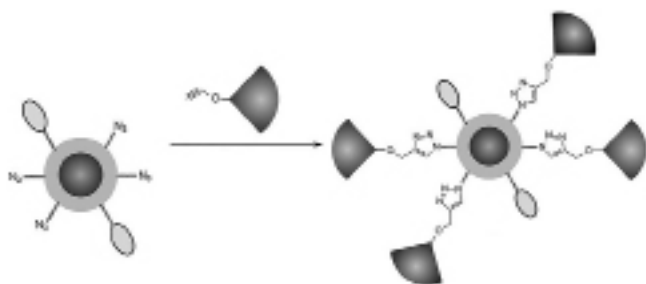
آهن متصل کردند. نانوذرات به دست آمده نسبت به سلول‌های سرطانی که روی سطح خود گیرنده‌های فولیک اسید دارند، بسیار اختصاصی عمل می‌کنند. در طرح ۶ روش کلی قرار دادن فولیک اسید بر سطح نانوذرات آهن آورده شده است [۲۵].

برای اتصال مولکول‌های پروتئین روی سطح نانوذرات از واکنش‌هایی مثل تشکیل پیوند آمیدی، باز شیف (Shiff-base) و افزایش هسته‌دوستی به اپوکسیدها استفاده می‌شود. در این واکنش‌ها، چون احتمال واکنش‌های جانبی هم وجود دارد، برای اتصال پروتئین‌ها زیاد مناسب نیستند. چون پیوندهای کووالانسی تصادفی ممکن است فعالیت پروتئین را روی سطح جامد کاهش دهند، افزون بر اتصال با پیوند شیمیایی، اتصال پروتئین روی سطح نانوذرات با استفاده از برهم‌کنش‌های غیرکووالان هم می‌تواند انجام گیرد. در این روش، پروتئین‌ها را می‌توان با جهت‌گیری مناسب روی نانوذرات چسباند. ولی مشکلی که

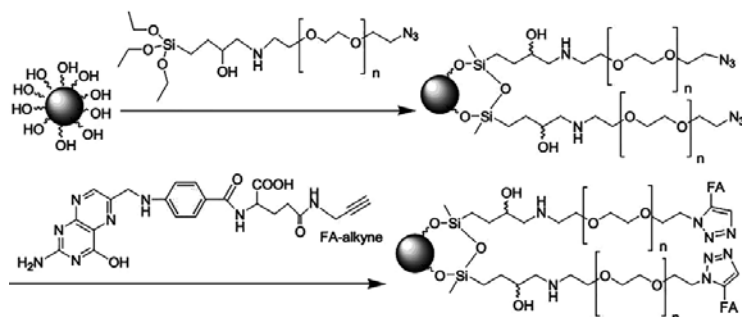
نانوذرات بیشتر شده و پتانسیل زتای آن مثبت‌تر می‌شود. در طرح ۴ مراحل ساخت نسل سوم درختواره‌های پلی(استر آمین) از راه واکنش کلیک آورده شده است [۲۳].

همان طور که قبلاً بیان شد، واکنش کلیک تحت تاثیر ممانعت فضایی قرار نمی‌گیرد و واکنش تحت این شرایط هم انجام می‌شود. گیلیس (Gillies) و همکاران از این ویژگی واکنش کلیک استفاده کردند و درختواره‌های با هسته پیوند سه‌گانه از پیش سنتز شده را با نانوذرات آزیددار وارد واکنش کرده و نانوذرات اصلاح شده را سنتز کردند (طرح ۵) [۲۴]. افزون بر به کارگیری واکنش کلیک در اتصال پلیمرها به نانوذرات آهن، از این واکنش برای هدفمند کردن فعال نانوذرات با استفاده از فولیک اسید هم استفاده شده است.

گروه ماناسمیتا (Manasmita)، فولیک اسید را با استفاده از پروپارژیل آمین اصلاح و با واکنش کلیک روی سطح نانوذرات



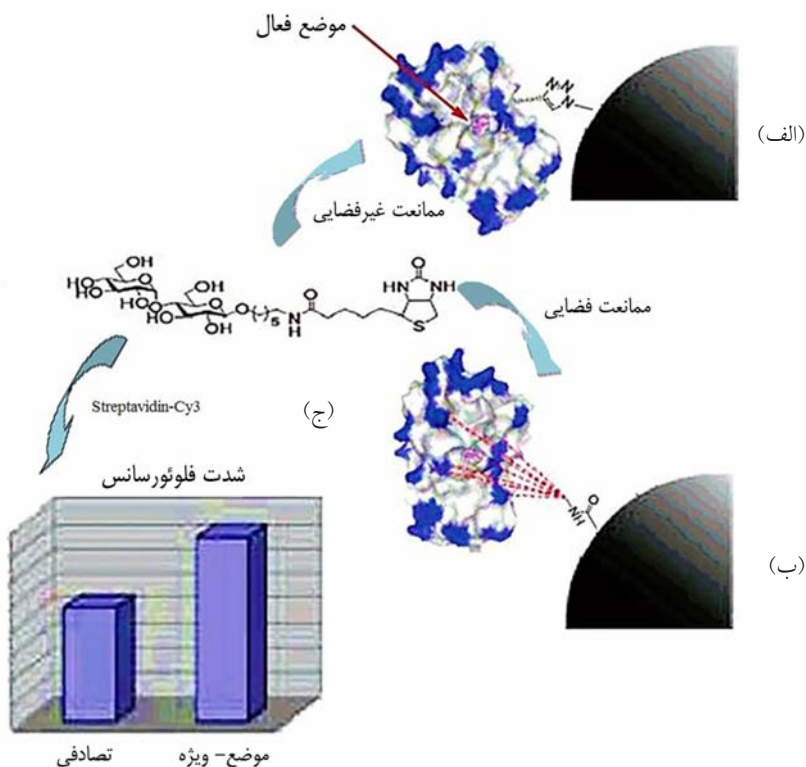
طرح ۵- استفاده از واکنش کلیک برای اتصال همگرای درختواره‌ها به نانوذرات آهن [۲۴].



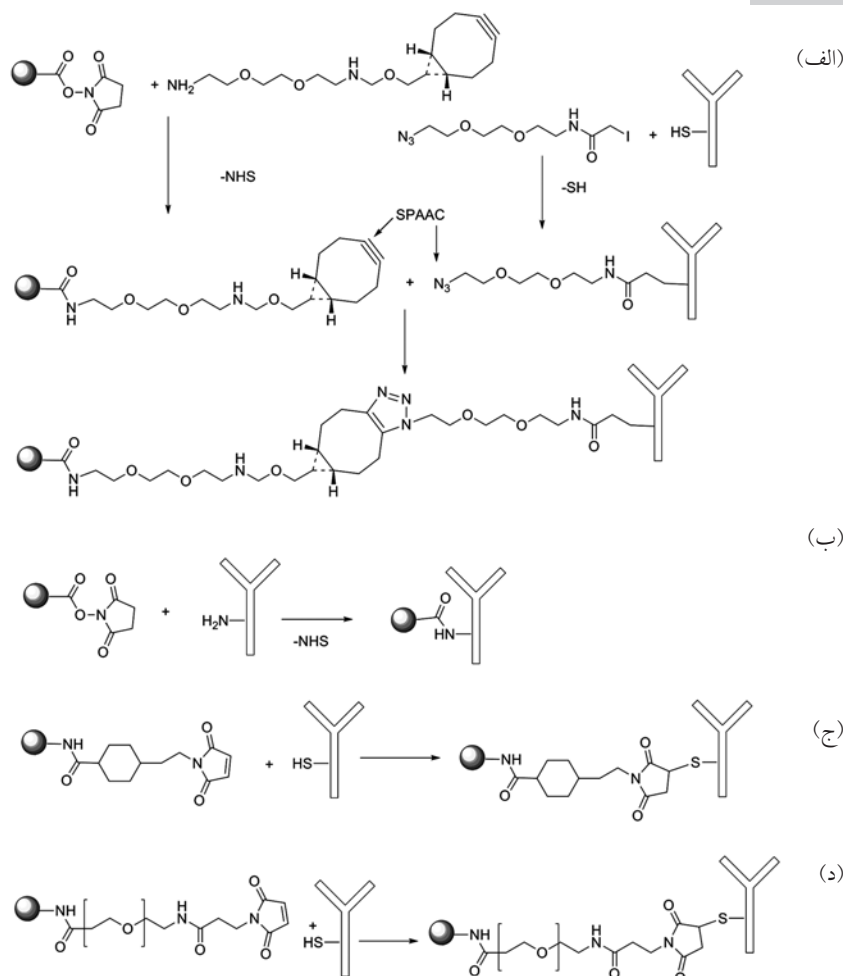
طرح ۶- عامل دار کردن نانوذرات آهن با فولیک اسید به روش کلیک برای استفاده در گرمادرمانی [۲۵].

این پروتئین را نیز با پیوندهای غیراختصاصی آمیدی روی سطح نانوذره متصل کردند. این پژوهشگران مشاهده کردند، مقدار پروتئینی که در دو روش روی سطح نانوذره قرار می‌گیرد، تقریباً برابر است. برای بررسی مقدار فعالیت پروتئین متصل شده، نانوذرات در محیط مالتوز بیوتین دار شده قرار گرفت. سپس آنها در مجاورت استرپتاویدین با طیف‌سنجی فلورسانس بررسی شدند. مشخص شد، برای نانوذرات آهن که پروتئین به روش کلیک نشانده شده است، جذب مالتوز تقریباً دو برابر حالت دوم است (شکل ۳). چون مقدار پروتئین متصل شده روی نانوذرات

این روش دارد این است که اگر نانوذرات برای مدت طولانی نگه‌داری شوند، امکان تفکیک پروتئین از سطح نانوذرات بسیار زیاد است. برای رفع مشکل جهت‌گیری و اتصال دائمی، واکنش کلیک گزینه بسیار مناسبی است. گروه لین (Lin) برای بررسی اینکه آیا پروتئین پس از اتصال روی سطح نانوذرات فعالیت خود را حفظ می‌کند یا نه، از پروتئین MBP (maltose binding protein) استفاده کردند. آنها برای اتصال این پروتئین روی سطح نانوذرات آهن از مشتق عامل‌دار شده آن با آلکین استفاده کرده و با یک مرحله واکنش کلیک، پروتئین را متصل کرده و به طور هم‌زمان



شکل ۳- نانوذرات اصلاح شده با پروتئین MBP: (الف) تثبیت اختصاصی با واکنش کلیک، (ب) اتصال تصادفی با پیوند آمیدی و (ج) شدت فلورسانس اندازه‌گیری شده از دو نوع نانوذرات پس از برهم‌کنش با مالتوز بیوتین دار شده [۲۶].



طرح ۷- اتصال پادتن روی سطح نانوذرات آهن با استفاده از واکنش‌های: (الف) حلقه‌زایی [۲+۳]، (ب) تشکیل پیوند آمیدی، (ج) تیول با پیوند دوگانه و (د) تیول با پیوند دوگانه در مجاورت پلی(اتیلن گلیکول) به عنوان حواسط [۲۶].

پلی(اتیلن گلیکول) به عنوان حواسط، بین ۷/۲-۶ به ازای ۱ μg نانوذرات آهن است. وارد کردن حواسط انعطاف‌پذیر پلی(اتیلن گلیکول) به جای سیکلوهاگزان سفت باعث افزایش در مقدار پادتن متصل می‌شود. ولی نکته جالب توجه این است که افزایش طول زنجیر پلی(اتیلن گلیکول) اثری روی مقدار اتصال پادتن ندارد. درصد فعالیت پادتن‌های متصل نیز بررسی و مشخص شد، آنهایی که به روش حلقه‌زایی [۲+۳] تثبیت شده بودند ۶۱٪ فعالیت خود را حفظ می‌کنند. این مقدار برای اتصال با پیوند آمیدی ۲۸٪ و برای واکنش پادتن تیول‌دار شده با نانوذرات حامل پیوند دوگانه (در بود یا نبود حد واسط پلی(اتیلن گلیکول)) برابر با ۹۲-۸۸٪ است (شکل ۴). نتایج حاکی از آن است که حلقه‌زایی [۲+۳] نسبت به تشکیل پیوند آمیدی بسیار مناسب‌تر بوده، ولی نتایج نسبت به واکنش تیول با پیوند دوگانه ضعیف‌تر است [۲۷].

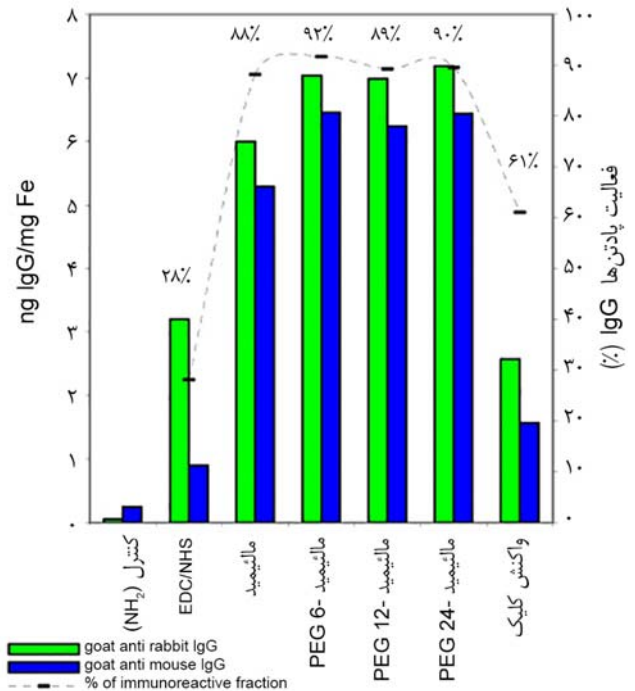
در هر دو روش یکسان بود، بنابراین آنها به این نتیجه رسیدند، اختلاف مزبور به خاطر تغییر کمتری است که در ساختار پروتئین با اتصال به روش کلیک انجام می‌گیرد [۲۶]. بررسی مشابهی نیز روی پادتن مدل انجام گرفته است. در این کار، گروه گروتز (Grüttner) پادتن‌های ثانویه goat anti-rabbit و goat anti-mouse را با استفاده از واکنش‌های مختلف نظیر کلیک [۲+۳]، تشکیل پیوند آمیدی، واکنش‌های پادتن تیول‌دار شده با پیوند دوگانه و با پیوند دوگانه در مجاورت حد واسط پلی(اتیلن گلیکول) روی نانوذرات آهن پوشش یافته با نشاسته نشانند و مقدار جذب و فعالیت پادتن را در آنها مقایسه کردند (طرح ۷). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد، مقدار پادتن که در روش حلقه‌زایی [۲+۳] و تشکیل پیوند آمیدی روی سطح نانوذرات قرار می‌گیرد، در حدود ۲/۵-۳/۲ μg به ازای ۱ mg نانوذرات آهن است. این مقدار برای واکنش تیول با پیوند دوگانه در بود و نبود

نتیجه گیری

برای افزایش قابلیت استفاده از نانوذرات آهن در کاربردهای زیستی، لازم است که سطح آنها اصلاح شود تا بتوان خواصی نظیر پایداری، سازگاری با محیط و بارگذاری دارو را روی آنها فراهم کرد. سطح این نانوذرات بسته به مقاصدی که از آنها انتظار می‌رود، با استفاده از مولکول‌های کوچک یا پلیمرها اصلاح می‌شوند. شرط لازم برای انجام یک واکنش شیمیایی موفق برای اتصال مولکول‌ها روی سطح نانوذرات، انجام آن با بهره زیاد است. چون واکنش روی سطح جامد به طور خود به خود دشوار است و اگر بازده واکنش هم کم باشد، در این حالت پوشش با چگالی مورد نظر روی سطح نانوذرات اتفاق نخواهد افتاد. تا به امروز، انواع واکنش‌های شیمیایی برای این کاربرد استفاده شده است که در این بین واکنش‌های کلیک در سال‌های اخیر بیشتر مورد توجه واقع شده‌اند. این واکنش با بهره زیاد، سرعت مناسب و شرایط ملایم در دمای محیط انجام می‌شود تا بدان اندازه مطلوب است که از این واکنش برای اتصال مولکول‌های کوچک، پلیمرها، پروتئین‌ها و پادتن‌ها استفاده شده و نتایج قابل قبولی نیز از آن به دست آمده است.

مراجع

1. Wahajuddin S.A. and Arora S., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Magnetic Nanoplatforms as Drug Carriers, *Int. J. Nanomedicine*, **7**, 3445-71, 2012.
2. Jain T.K., Morales M.A., Sahoo S.K., Leslie-Pelecky D.L., and Labhasetwar V., Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents, *Mol. Pharm.*, **2**, 194-205, 2005.
3. Gupta, A.K. and Gupta M., Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications, *Biomaterials*, **26**, 3995-4021, 2005.
4. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., and Muller R.N., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications, *Chem. Rev.*, **108**, 2064-2110, 2008.
5. Rosen J.E., Chan L., Shieh D.B., and Gu F.X., Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Imaging and Diagnostics, *Nanomedicine*, **8**, 275-290, 2012.
6. Schwertmann U. and Cornell R.M., *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*, John Wiley & Sons, Weinheim, Germany, 2008.
7. Napper D.H., Steric Stabilization and the Hofmeister Series, *J. Colloid Interface Sci.*, **33**, 384-392, 1970.
8. Fritz G., Schädler V., Willenbacher N., and Wagner N.J., Electrosteric Stabilization of Colloidal Dispersions, *Langmuir*, **18**, 6381-6390, 2002.
9. Ortega-Vinuesa J., Rodriguez A.M., and Hidalgo-Alvarez R., Colloidal Stability of Polymer Colloids with Different Interfacial Properties: Mechanisms, *J. Colloid Interface Sci.*, **184**, 259-267, 1996.
10. Kobayashi M., Skarba M., Galletto P., Dusko Cakara D., and Borkovec M., Effects of Heat Treatment on the Aggregation and Charging of Stöber-type Silica, *J. Colloid Interface Sci.*, **292**, 139-147, 2005.
11. Cornell R.M. and Schwertmann U., *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, John Wi-



شکل ۴- مقدار اتصال و فعالیت پادتن‌های goat anti-rabbit و goat anti-mouse روی نانوذرات آهن با استفاده از روش‌های اتصال متفاوت [۲۶].

- ley & Sons, Weinheim, Germany, 2003.
12. Sahoo Y., Pizem H., Fried T., Golodnitsky D., Burstein L., Sukenik C.N., and Markovich G., Alkyl Phosphonate/Phosphate Coating on Magnetite Nanoparticles: A Comparison with Fatty Acids, *Langmuir*, **17**, 7907-7911, 2001.
 13. Zhang C., Wängler B., Morgenstern B., Zentgraf H., Eisenhut M., Untenecker H., Krüger R., Huss R., Seliger C., Semmler W., and Kiessling F., Silica-and Alkoxysilane-Coated Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Particles: A Promising Tool to Label Cells for Magnetic Resonance Imaging, *Langmuir*, **23**, 1427-1434, 2007.
 14. Lin J., Zhou W., Kumbhar A., Wiemann J., Fang J., Carpenter E.E., and O'Connor C.J., Gold-Coated Iron (Fe@Au) Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Magnetic Field-Induced Self-assembly, *J. Solid State Chem.*, **159**, 26-31, 2001.
 15. Shepherd P.G., Popplewell J., and Charles S., A Method of Producing Ferrofluid with Gadolinium Particles, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **3**, 1985-1986, 1970.
 16. Sun Y., Duan L., Guo Z., Duanmu Y., Ma M., Xu L., Zhang Y., and Gu N., An Improved way to Prepare Superparamagnetic Magnetite-Silica Core-Shell Nanoparticles for Possible Biological Application, *J. Magn. Magn. Mater.*, **285**, 65-70, 2005.
 17. *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Häfeli U., Schütt W., Teller J., and Zborowski M. (Eds.), Plenum, New York, 1997.
 18. Arshady R., *Radiolabeled and Magnetic Particulates in Medicine and Biology*, Citus Books, Pennsylvania, **2**, 2001.
 19. Kolb H.C., Finn M., and Sharpless K.B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a few good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2004-2021, 2001.
 20. Hayashi K., Ono K., Suzuki H., Sawada M., Moriya M., Sakamoto W., and Yogo T., One-pot Biofunctionalization of Magnetic Nanoparticles via Thiolen Click Reaction for Magnetic Hyperthermia and Magnetic Resonance Imaging, *Chem. Mater.*, **22**, 3768-3772, 2010.
 21. Hayashi K., Ono K., Suzuki H., Makoto S., Makoto M., Sakamoto W., and Yogo T., Chemoselective Synthesis of Folic Acid- Functionalized Magnetite Nanoparticles via Click Chemistry for Magnetic Hyperthermia, *Chem. Mater.*, **21**, 1318-1325, 2009.
 22. Li N. and Binder W.H., Click-chemistry for Nanoparticle-Modification, *J. Mater. Chem.*, **21**, 16717-16734, 2011.
 23. Li M., Xu L.Q., Wang L., Wu Y.P., Li J., Neoha K.G., and Kang E.T., Clickable Poly(ester amine) Dendrimer-grafted Fe₃O₄ Nanoparticles Prepared via Successive Michael Addition and Alkyne-azide Click Chemistry, *Polym. Chem.*, **2**, 1312-1321, 2011.
 24. Martin A.L., Bernas L.M., Rutt B.K., Foster P.J., and Gillies E.R., Enhanced Cell Uptake of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Dendritic Guanidines, *Bioconjugate Chem.*, **19**, 2375-2384, 2008.
 25. Das M., Bandyopadhyay D., Singh R.P., Harde H., Kumar S., and Jain S., Orthogonal Biofunctionalization of Magnetic Nanoparticles via "Clickable" Poly(ethylene glycol) Silanes: A "Universal Ligand" Strategy to Design Stealth and Target-Specific Nanocarriers, *J. Mater. Chem.*, **22**, 24652-24667, 2012.
 26. Lin P.C., Ueng S.H., Yu S.C., Jan M.D., Adak A.K., Yu C.C., and Lin C.C., Surface Modification of Magnetic Nanoparticle via Cu(I)-Catalyzed Alkyne-azide[2+3] Cycloaddition., *Org. Lett.*, **9**, 2131-2134, 2007.
 27. Gruttner C., Muller K., and Teller J., Comparison of Strain-promoted Alkyne-azide Cycloaddition with Established Methods for Conjugation of Biomolecules to Magnetic Nanoparticles, *IEEE Trans. Magn.*, **49**, 172-176, 2013.