دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و دوم، شماره ۳، صفحه ۱۷۳ - ۱۶۰ (مرداد و شهریور ۱۳۹۸)

Iran South Med J 2019; 22(3): 160-173

# طراحی، سنتز و نشاندار سازی مشتقات تری‌پپتیدی با استفاده از تکنسیم$^{99m}$ برای تشخیص بافت هیپوکسی

محمدحسن هوشدارتهرانی (PhD)[1*]، مهتاب محمدپور (Pharm D)[2]، ثریا شاه‌حسینی (PhD)[1]

[1] گروه شیمی داروئی و داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران
[2] واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۰/۱۱- پذیرش مقاله: ۹۷/۱۲/۲۲)

## چکیده

**زمینه:** در بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان، ایسکمی و تومورها هیپوکسی بافتی وجود دارد. پس شناسایی و تشخیص بافت هیپوکسی با ترکیباتی که قابلیت نفوذ و ماندگاری را در سلول هیپوکسی داشته باشند، از اهمیت بسزائی برخوردار می‌باشد. استفاده از پپتیدهای با وزن مولکولی کم، حساس به محیط اکسیداسیون احیا، با نفوذ بافتی بهتر از آنتی بادی‌ها و پروتیئن‌ها و با خصوصیت آنتی‌ژنیک کم می‌تواند انتخاب مناسبی برای این منظور باشد. بنابراین نشاندارسازی مشتقات پپتیدی چربی دوست حامل ترکیبات نیترو با تکنسیم رادیو اکتیو ($^{99m}$Tc)، به دلیل جذب و ماندگاری بالا در سلول‌های هیپوکسی می‌توانند به عنوان معرف‌های تشخیصی مناسب برای تصویربرداری از بافت هیپوکسی تومورها مورد استفاده قرار گیرند تا اقدامات درمانی به موقع و مؤثرتر سرطان انجام گیرد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تری‌پپتیدهایی که به انتهای آن‌ها گروه پارانیتروبنزوئیک اسید (PNBA) اضافه شده است، به روش سنتز بر روی فاز جامد (Fmoc SPPS) و با رزین ونگ (Wang resin) سنتز شدند که شناسایی تشکیل آن‌ها توسط اسپکترومتری جرمی انجام گرفت. پپتیدهای سنتز شده با $^{99m}$Tc نشاندار شدند. خصوصیات فیزیکوشیمیایی و خلوص رادیو شیمیایی پپتیدهای نشاندار شده حاصل توسط تکنیک کروماتوگرافی و تعیین ضریب توزیع مورد بررسی قرار گرفت. همچنین به منظور ارزیابی جذب و ماندگاری پپتیدهای نشاندار شده در سلول‌ها در طول زمان‌های ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه، از سلول‌های MCF-7 در شرایط نرمال و هیپوکسی شده توسط جار هیپوکسی استفاده گردید.

**یافته‌ها:** سنتز پپتیدها بازده خوبی (۷۰ تا ۷۸ درصد) را به‌دست داد. پپتیدهای سنتز شده و نشاندار از پایداری خوبی در نرمال سالین و پلاسمای انسانی تا حداقل ۴ و ۶ ساعت به ترتیب برخوردار بودند. خلوص رادیوشیمیایی پپتیدهای سنتز شده حدود ۹۴ درصد بود و لیپوفیلیسیته پپتیدهای حاصل قابل قبول (لگاریتم ضریب توزیع آن‌ها ۰/۰۰۶-) تشخیص داده شد. نتایج همچنین نشان داد که پپتیدهای نشاندار شده در سلول‌های هیپوکسی ماندگاری بیشتری نسبت به سلول‌های نرمال دارند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، مشتقات پپتیدی نشاندار شده با تکنسیم$^{99m}$ می‌توانند به عنوان معرف‌های مناسب برای تشخیص بافت‌های هیپوکسی به خدمت گرفته شوند.

**واژگان کلیدی:** سنتز فاز جامد، پپتید، نشاندار سازی، تکنسیم$^{99m}$، هیپوکسی

* تهران، گروه شیمی داروئی و داروسازی هسته‌ای، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران
**Email: m_houshdar@sbmu.ac.ir**
***ORCID: 0000-0001-9820-4156**

[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

## مقدمه

هیپوکسی به کاهش اکسیژن در سطح سلولی گفته می‌شود. هیپوکسی می‌تواند در اثر ایسکمی (خون ناکافی) و یا هیپوکسمی ($O_2$ ناکافی) ایجاد شود که متداول‌ترین آن ایسکمی است. ایسکمی حالتی است که در آن تقاضا برای اکسیژن بیشتر از عرضه اکسیژن می‌باشد (۱). در بافت توموری تقاضا بیشتر از عرضه‌ی اکسیژن است و بنابراین با کاهش فشار اکسیژن در بافت توموری مواجه هستیم (۱ و ۲). بافت هیپوکسی توموری به علت کاهش سطح خون‌رسانی و به تبع کاهش دارورسانی، به شیمی درمانی و رادیوتراپی مقاوم می‌باشد (۶-۳). بنابراین تشخیص به موقع بافتی که دچار کمبود اکسیژن شده است در تشخیص و پیگیری روند درمان حائز اهمیت خواهد بود. اگر بافت هیپوکسی به موقع شناسایی و درمان نشود، به مرور به بافت مرده و نکروزه تبدیل می‌شود و این حالت برای ارگان‌های حیاتی بسیار تهدید کننده است (۳ و ۷).

بنابراین شناسایی بافت هیپوکسی توسط ترکیباتی که تمایل کافی و مناسب را به بافت هیپوکسی داشته باشند، بسیار حائز اهمیت است. این ترکیبات باید بتوانند به داخل بافت هیپوکسی نفوذ کرده و قابلیت ماندگاری را حداقل برای مدتی که بافت هیپوکسی توسط سیستم‌های تصویربرداری مانند دوربین‌های گاما قابل رؤیت باشد، را داشته باشند. از طرفی این ترکیبات نباید برای بافت هیپوکسی و بافت‌های دیگر سمی باشند (۳). نیتروایمیدازول‌ها از ترکیباتی هستند که در متابولیسم‌های داخل سلولی (بسته به میزان اکسیژن داخل سلول) شرکت می‌کنند و از اولین ترکیباتی هستند که به عنوان عوامل تصویربرداری بافت هیپوکسی معرفی شده‌اند (۸). وقتی نیتروایمیدازول وارد یک سلول زنده می‌شود توسط یک الکترون احیا شده و در حضور میزان معمول اکسیژن موجود در سلول مجدداً اکسید شده و امکان خروج مجدد آن از سلول فراهم می‌شود. اما در بافت هیپوکسی امکان اکسیداسیون مجدد وجود ندارد و مولکول یک مرحله دیگر احیا شده و به اجزا داخل سلول متصل و در بافت به تله می‌افتد (۸). ترکیباتی بر اساس ساختمان نیترو ایمیدازول‌ها طراحی و سنتز شده‌اند (۹). این ترکیبات با رادیونوکلوئیدهای مختلف نشاندار شده و در مطالعات به کار رفته‌اند. در مقاله‌ای، ترکیب پیمونیدازول (Pimonidazole) مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه جذب و نفوذ پیمونیدازول به داخل بافت هیپوکسی سلول‌های کارسینومای رحم مورد بررسی قرار گرفت و با پاسخ‌دهی ۹ بیمار از ۱۰ بیمار مورد سنجش، فرضیه اولیه مبنی بر موفق بودن نفوذ پیمونیدازول به درون بافت هیپوکسی، تأیید شد (۱۰). در مقاله دیگری ترکیب BRU59-21 که مشتقی از نیتروایمیدازول است، با $^{99m}Tc$ نشاندار شد و جذب و ماندگاری آن در سلول، در شرایط حضور و عدم حضور اکسیژن مورد بررسی قرار گرفته است.در این مقاله بیان شده است که انتقال رادیو دارو به خارج از سلول، بستگی مستقیم به غلظت اکسیژن سلولی دارد. در شرایط بی‌هوازی و عدم حضور اکسیژن در سلول، خروج رادیودارو از سلول کمتر شده و در نتیجه غلظت رادیودارو و ماندگاریش در سلول بیشتر می‌شود (۱۱). بهر حال، حذف شدن نیترو ایمیدازول‌ها از بافت‌های سالم، زمان بر است و به علت غلظت نسبتاً کم نیتروایمیدازول در محل بافت هیپوکسی، تشخیص ناحیه هیپوکسی با مشکل مواجه است. بنابراین نیاز به ترکیباتی است که براحتی نشاندار شده و قابلیت نفوذ و ماندگاری در بافت هیپوکسی را داشته باشند و سمی هم نباشند. استفاده از پپتیدها با وزن مولکولی کم به عنوان جایگزین پروتئین در موارد



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

تشخیصی و درمانی در پزشکی هسته‌ای مورد توجه می‌باشد (۱۲)، زیرا پپتیدها نسبت به آنتی بادی‌ها و پروتئین‌ها کوچک‌تر بوده و نفوذ بافتی بهتری را دارا می‌باشند. از طرفی سنتز و نشاندار کردن آن‌ها با رادیوایزوتوپ‌ها راحت‌تر می‌باشد و در عین حال آنتی‌ژنیسیته نداشته و واکنش‌های حساسیتی کمتری را ایجاد می‌کنند (۳ و ۷). اولین بار، پپتیدی را با $^{111}In$ برای استفاده در پزشکی هسته‌ای، نشاندار شد (۱۳). چندین سال بعد در مقاله‌ای، سنتز ۲۸ پپتید گزارش شدکه نشاندارسازی آن‌ها با رادیونوکلئید $^{99m}Tc$ مورد بررسی قرار گرفت. در این مقاله، نتیجه شد که هر پپتیدی با هر اسید آمینه‌ای قادر به نشاندار شدن نمی‌باشد. در واقع اسید آمینه‌های خاصی مانند سیستئن، گلیسین و سرین قابلیت برقراری پیوند با پرتکنتات را دارند (۱۴). در مقاله‌ای چاپ شده، که در آن پپتیدی با ۸ آمینو اسید که عمدتاً دارای لوسین بود (ML پپتید) سنتز و با $^{64}Cu$ نشاندار شد تا میزان جذب آن در بافت سرطانی پروستات مورد بررسی قرار گیرد. (۱۵). در مقاله‌ی دیگری، پپتیدی با سکانس ۱۰ اسید آمینه سنتز شد و توسط رادیوایزوتوپ $^{99m}Tc$ نشاندار شد و میزان تمایل آن به پلی‌پپتیدی از سلول‌های نوتروفیل پستانداران، بررسی و آزمایش شد (۱۶). مقاله‌ای دیگر در زمینه‌ی میزان جذب پپتیدها توسط سلول‌های توموری منتشر شد. در این مقاله پپتیدی سنتز شد، که هر دو بخش ابتدایی و انتهایی آن توسط پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) محافظت شده و سپس توسط رادیوایزوتوپ فلوئور-۱۸ نشاندار شد و میزان جذب آن در سلول‌های توموری موش مورد بررسی قرار گرفت. در این مقاله وجود PEG را به علت افزایش لیپوفیلیسیته پپتید مناسبی دانستند و جذب پپتید به داخل بافت مربوطه را مثبت برآورد کردند (۱۷). برای نشاندار کردن مولکول‌های شیمیایی، رادیونوکلئیدی مورد نظر است که خصوصیات فیزیکی مناسب (نیمه عمر، مقدار انرژی و فراوانی تابش‌های گاما) را داشته باشد، براحتی در دسترس و ارزان باشد. تکنسیوم$^{99m}$ با نیمه عمر ۶ ساعت، تابش گاما با انرژی ۱۴۰ KeV و فراوانی ۹۰ درصد به راحتی از طریق ژنراتور $^{99}Mo/^{99m}Tc$ در دسترس بوده و ارزان قیمت نیز می‌باشد. در عین حال به علت شیمی مناسب و شناخته شده تکنسیوم$^{99m}$، نشاندار کردن ترکیبات با آن راحت‌تر است (۱۳). در این راستا، ترکیبات پپتیدی در اتصال به نیترو ایمیدازول‌ها به عنوان شلاتور تکنسیم$^{99m}$ برای شناسایی تومورهای هیپوکسی به‌کار رفته‌اند (۱۸) در تحقیق حاضر دو پپتید با زنجیره کوتاه که حامل یک ترکیب نیترودار است سنتز و با رادیونوکلئید $^{99m}Tc$ نشاندار گردیده است و ترکیبات حاصل مورد ارزیابی فیزیکوشیمیایی همراه با مطالعات جذب سلولی آن‌ها در شرایط هوازی و بی‌هوازی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

### مواد و دستگاه‌ها

رزین ونگ (Wang resin) و آمینو اسیدهای با آمین محافظت شده توسط گروه فلورونیل متوکسی کربونیل (Fmoc-AA)، معرف‌های سنتز پپتید از جمله هیدروکسی بنز تریازول (HOBt) و دی ایزو پروپیل کربودی ایمید (DIC)، از شرکت باخم (Bachem) سوئیس وسانتا کروز (Santa Crus) آمریکا، حلال‌های لازم، پی‌پرازین، پارانیتروبنزوئیک اسید، اسید تری فلوئورو استیک از شرکت مرک (Merck) خریداری شد. راکتور شیشه‌ای استوانه‌ایی فیلتردار از بخش خصوصی خریداری شد. دستگاه‌های آنالیز از جمله کروماتوگرافی با کارکرد بالا (HPLC) و نگارنده جرمی



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

متصل به دستگاه کروماتوگرافی مایع (LC-MS) از شرکت شیماتزوی ژاپن می‌باشند. ژنراتور $^{99}Mo/^{99m}Tc$ از شرکت پارس ایزوتوپ، تهران تهیه شد. دستگاه دوز کالیبراتور از سازمان انرژی اتمی خریداری شده است. دستگاه جار هیپوکسی سفارش داخل بوده و از بخش خصوصی خریداری شده است.

## سنتز پپتیدهای (۱) PNBA-SVC و (۲) PNBA-IAC

مراحل سنتز پپتید ها به شرح زیر است.

داخل واکنش‌گاه مقدار ۱ گرم رزین ونگ به همراه ۱۰ میلی‌لیتر مخلوط دی متیل فرمامید و دی کلرومتان (به نسبت ۱:۱) برای مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد تا متورم گشت. مقدار ۱/۱۷ گرم از اسید آمینه سیستئین محافظت شده Fmoc-Cys به همراه ۰/۲۸۴ گرم هیدروکسی بنزتریازول (HOBt) و ۰/۲ میلی‌لیتر دی ایزوپروپیل کربودی ایمید (DIC) در ۵ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید حل شد و به رزین متورم اضافه گشت. به این مجموعه، ۰/۰۱۲۲ گرم دی‌متیل آمینو پیریدین (محلول در ۳ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید) اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۴ ساعت توسط دستگاه همزن، در حرارت آزمایشگاه هم زده شد. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر پیریدین به محیط واکنش افزوده شد و همزدن به مدت یک ساعت دیگر ادامه یافت. به منظور برداشتن گروه محافظ آمین انتهایی آمینو اسید متصل به رزین، ۱۰ میلی‌لیتر پی‌پرازین (۱۰ درصد در دی متیل فرمامید) به واکنش‌گاه اضافه شد. برای اتصال آمینو اسید دوم به آمینو اسید اول متصل به رزین، ۱/۴ میلی‌مول آمینو اسید والین (یا آلانین) همراه با HOBt و DIC محلول در دی متیل فرمامید (با مقادیر ذکر شده در بالا) به واکنش‌گاه افزوده شد. پس از همزدن واکنش به مدت ۴ ساعت، محافظت‌برداری از گروه آمین آمینو اسید دوم متصل به رزین صورت گرفت و آمینو اسید سوم سرین (یا ایزو لوسین) برای اتصال به پپتید متصل به رزین به واکنش‌گاه اضافه شد. در انتها، از ۱/۴ میلی‌مول پارانیتروبنزوئیک اسید بمانند یک آمینو اسید برای اتصال به زنجیره تری‌پپتیدی متصل به رزین استفاده گشت. سرانجام رزین حاوی تری‌پپتید متصل به ترکیب نیتره، با حلال‌های دی متیل‌فرمامید، دی کلرومتان و متانول (هر کدام سه بار) شستشو داده شد و سپس رزین تحت خلاء خشک گردید. از ۵۰ درصد اسید تری فلوئورو استیک در دی کلرومتان حاوی مواد کمکی (scavengers) (شامل ۷ تا ۸ قطره آنیزول و ۱۰۰ میکرولیتر تری ایزوپروپیل سیلان و ۱۰میکرولیتر آب و ۰/۲ گرم فنول) برای جداسازی پپتید حاوی ترکیب نیتره از رزین استفاده شد. محلول پپتیدی حاصل پس از جدایی از رزین و صاف شدن، به‌صورت قطره قطره به دی اتیل اتر سرد اضافه گشت و رسوب تشکیل شده از اتر جدا و برای آزمایش‌های بعدی در جای سرد و خشک نگهداری شد. برای تعیین خلوص شیمیایی پپتیدها از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به همراه نگارنده‌ی جرمی (Lc-MS) استفاده شد.

## نشاندارسازی پپتیدهای سنتز شده

**مواد لازم:** محلول ذخیره پپتید (با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر متانول)، محلول دی سدیم تارتارات (۰/۲ مولار در آب)، بافر استات آمونیوم (۰/۵ مولار با pH برابر ۶/۲)، پرتکنتات سدیم ($NaTcO_4$) (که از ژنراتور $^{99}Mo/^{99m}Tc$ به کمک ویال خلاء و شستشو با سدیم کلراید ۰/۹ درصد استریل، به‌طور تازه تهیه می‌شود.)، محلول کلرید قلع ($SnCl_2$) به غلظت یک میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار.



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

**روش کار:** در یک ویال واکنش، پپتید مورد نظر (۵۰ میکرولیتر)، سدیم تارتارات (۲۰۰ میکرولیتر)، آمونیوم استات (۴۰ میکرولیتر)، کلرید قلع (۵۰ میکرولیتر)، سدیم پرتکنتات (۷-۱۰ میکرو کوری) اضافه شد. و ویال به‌مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت یک سپر سربی در دمای اتاق انکوبه شد تا کمپلکس تشکیل گردد.

**تعیین بازده نشاندارسازی**

به‌منظور حذف ناخالصی‌ها، محتوی ویال واکنش از کارتریج $C_{18}$ عبور داده شد و کارتریج با آب مقطر (۱۰ میلی‌لیتر) برای حذف $^{99m}TcO_2$ و $^{99m}TcO_4^-$ شستشو داده شد. سپس پپتید نشاندار شده توسط شستشو با اتانول ۹۶ درصد (۱۰ میلی‌لیتر) از کارتریج جدا شد و کارآئی نشاندارسازی با توجه به اکتیویته کل طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{کارائی نشاندار سازی}\% = \frac{\text{فعالیت فاز آلی}}{\text{فعالیت کل}} \times 100$$

**بررسی خلوص رادیو شیمیایی پپتیدهای (RCP%) نشان‌دار شده**

بر روی هر یک از دو ورقه کروماتوگرافی غشأ نازک (TLC) سلیکاژل به ابعاد ۲×۱۰ سانتی‌متر، مقدار ۱تا ۱۰ میکرولیتر از محتویات واکنش لکه‌گذاری شد. ورقه اول در تانک حاوی اتیل متیل کتون به‌عنوان حلال بالا برنده (فاز متحرک) و ورقه دوم در تانک حاوی آب مقطر و استونیتریل (به نسبت ۱:۱، به‌عنوان فاز متحرک) قرار گرفت. پس از انجام کروماتوگرافی، ورقه‌ها خشک شد و سپس با در نظر گرفتن میزان حرکت نمونه‌ها روی ورقه‌های کروماتوگرافی، آن‌ها به نسبت ۱/۳ از پایین و ۲/۳ از بالا برش داده شدند. فعالیت هرقسمت بریده شده توسط دستگاه گاما کانتر شمارش شد. برای ورقه اول (با حلال اتیل متیل کتون) فعالیت ۲/۳ بخش بالای ورقه به مقدار کل فعالیت ورقه مربوطه (۱/۳ به‌علاوه ۲/۳) تقسیم شد و حاصل به‌صورت درصد محاسبه شد. برای ورقه دوم (با حلال آب و استو نیتریل)، فعالیت ۱/۳ بخش پایینی به مقدار کل فعالیت ورقه مربوط تقسیم شد و حاصل به‌صورت درصد محاسبه شد. با جمع دو مقادیر بالاو کم کردن مجموعه از درصد کل (۱۰۰)، درصد پپتید نشان دار شده به‌دست آمد.

**بررسی میزان ضریب توزیع (تعیین Log P)**

در یک سیستم حلال دوفازی مرکب از سرم فیزیولوژی (نرمال سالین) و اکتانول (با حجم‌های برابر)، ۱۰۰ میکرولیتر پپتید نشان‌دار شده اضافه شد. پس از بهم خوردن دوفاز و ساکن شدن آن‌ها، از هر فاز ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و میزان فعالیت آن محاسبه گردید. لگاریتم نسبت فعالیت فاز آلی به فعالیت فاز آبی، لگاریتم ضریب توزیع (Log P) را به‌دست داد.

**بررسی پایداری پپتیدهای سنتز شده و نشاندار**

بررسی پایداری پپتیدهای سنتز شده توسط LC-Ms صورت گرفت. پپتیدها با پروتئین‌های پلاسما در حرارت $37^{\circ}C$ انکوبه شده و در زمان ۲ و ۴ ساعت پس از انکوباسیون، با اضافه کردن استونیتریل پروتئین‌های پلاسما رسوب کرده و پس از سانتریفیوز، مایع‌روئی یا سوپرناتانت توسط LC-Ms مورد ارزیابی قرارگرفت. به منظور ارزیابی پایداری پپتید نشاندار شده با $^{99m}Tc$ در نرمال سالین (محلول سدیم کلراید ۰/۹ درصد) و پلاسمای انسانی، ۲۰۰ میکرولیتر از رادیوپپتیدها به ۱۸۰۰ میکرولیتر پلاسمای انسانی و نرمال سالین به طور جداگانه افزوده و به ترتیب در دمای آزمایشگاه و $37^{\circ}C$ انکوبه شد. در زمان‌های ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از انکوباسیون، با تعیین خلوص رادیوشیمیائی از ظرف حاوی نرمال سالین میزان پایداری رادیوپپتید در نرمال



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

سالین مشخص شد و جهت بررسی پایداری در پلاسما، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ظرف حاوی پلاسما برداشته و ۱۰۰ میکرولیتر استونیتریل سرد به منظور رسوب پروتئین‌های پلاسمایی به هر یک از نمونه‌ها اضافه گردید. سپس نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰G به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و میزان اکتیویته در رسوب (پلت) و مایع‌رویی (سوپرناتنت) توسط شمارنده گاما تعیین شد. نسبت میزان اکتیویته سوپرناتنت به اکتیویته رسوب تعیین کننده مقدار پپتید پایدار (رادیوپپتید موجود در سوپرناتنت) به پپتید ناپایدار (رادیوپپتید حبس شده در رسوب) است. میزان اتصال رادیوپپتید به پروتئین‌های پلاسمایی از روی میزان اکتیویته رسوب تعیین گردید برای هر زمان سه نمونه در نظر گرفته شد.

### مطالعات جذب سلولی

**وسایل لازم:** جار هیپوکسی، گس پک بی‌هوازی، پتری دیش، پلیت‌های استریل ۶ خانه‌ایی.

جار هیپوکسی ظرفی استوانه‌ای با دهانه عریض و درب (سرپوشی) است که پلمپ شده و اجازه تبادل هوا با محیط خارج را نمی‌دهد. بر روی درب این ظرف خروجی متصل شونده به سیستم تولید $CO_2$ قرار دارد. در داخل درب این وسیله، یک بسته فلزی کوچک، حاوی ذرات فلزی پالادیوم قرار گرفته است. در شرایطی که نتوان از سیستم القای شرایط هیپوکسی بهره برد، داخل این ظرف یک گس‌پک قرار می‌گیرد که تولید $CO_2$ و $H_2$ می‌کند و در همراهی با بسته پالادیوم که نقش جذب اکسیژن محیط را ایفا می‌کند، شرایط هیپوکسی نسبی را برقرار می‌نماید. گس‌پک‌بی‌هوازی (Anaerobic Gas Pak) یک بسته‌ای ده خانه است. روی این خانه‌ها به وسیله پوششی از جنس کاغذ نم‌گیر پوشانده شده است. داخل هر خانه، مخلوطی از گرانول‌های ۴ ترکیب شیمیایی سدیم بوروهیدرات، سدیم بی‌کربنات، اسید سیتریک و کبالت کلراید است. این ترکیبات، هم تا حدی رطوبت محیط را جذب می‌کنند، هم با جذب اکسیژن محیط داخلی جار، شرایط هیپوکسی را فراهم می‌کنند.

### مطالعه در شرایط هوازی

در ابتدا سلول‌های MCF-7 در یک فلاسک حاوی محیط کشت RPM11640 (دارای بافر فسفات و آنتی‌بیوتیک) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور حاوی $CO_2$ ۵ درصد و رطوبت قرار گرفت. سپس سلول‌ها به کمک تریپسین ۵ درصد از فلاسک جدا شده و توسط سانتریفیوژ از محیط جدا شد. سلول‌ها به تعداد ۱۰۶ در هر دو خانه از ۴ پلیت ۶ خانه‌ایی استریل کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محیط کشت سلول‌های هر خانه آسپیره شد و خانه‌ها با محیط کشت تازه شستشو داده شد. هر یک از پپتیدهای نشاندار شده که با کارتریج $C_{18}$ خالص شده بود با حجمی که معادل با فعالیت ۱۰ میکروکوری بود به هر خانه از پلیت ۶ خانه‌ایی محتوی سلول‌ها اضافه شد. خانه‌های پلیت سپس با محیط کشت تازه تا حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر پر شد. پلیت‌ها در بازه‌های زمانی ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان زمان انکوباسیون اختصاص داده شده به هر پلیت، پلیت مربوطه از انکوباتور خارج شد و محیط‌رویی هر خانه تخلیه گردید. سلول‌های هر خانه ۳ تا ۵ مرتبه با ۲۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سرد استریل شستشو داده شد و بافر مربوطه تخلیه شد. سپس به هر خانه ۲۰۰۰ میکرولیتر سدیم استات ۴۰ میلی‌مولار سرد و استریل افزوده شد و پلیت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]
[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مدت، محیط مائی هر خانه با سمپلر جدا و به یک لوله میکرو سانتریفیوژ منتقل شد و سپس فعالیت پرتویی موجود در محلول (سوپرناتانت) توسط دستگاه گاما کانتر محاسبه شد. در مرحله آخر، به هر خانه ۲۰۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکساید ۱ مولار استریل اضافه شد تا در مدت ۳۰ ثانیه با حرکت دورانی پلیت‌ها، لیز سلولی هر خانه ایجاد شود. سپس محتویات هر خانه از پلیت‌ها با سمپلر خارج شد و با انتقال به لوله‌های میکروسانتریفیوژ از نظر میزان فعالیت پرتوزایی توسط دستگاه گاما کانتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

**مطالعه در شرایط بی‌هوازی**

پس از تکثیر سلول‌ها و جداسازی و شمارش آن‌ها مطابق روش بالا، تعداد ۱/۵×۱۰۶ سلول در داخل هر یک از چهار پتری دیش قرار گرفت. حجم محیط کشت در هر پتری دیش به میزان ۳۰۰۰ میکرولیتر تنظیم شد. پتری دیش‌ها برای تکثیر و چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف برای مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار گرفتند. پس از پایان انکوباسیون، پتری دیش‌ها درون جار هیپوکسی در مجاور یک گس‌پک بی‌هوازی آماده شده قرار گرفتند. در جار هیپوکسی یک بسته کوچک حاوی متیلن بلو قرار داده شد. رنگ این بسته در ابتدا آبی است ولی با افت فشار اکسیژن بی‌رنگ شده که مؤید ایجاد شرایط هیپوکسی در جار است. پس از ۴ ساعت، محیط کشت هر پتری دیش آسپیره شد و طبق روال قبل سلول‌ها با بافر تازه شستشو داده شدند. مقدار ۱۰ میلی‌کوری از هر پپتید نشاندار به هر پتر دیش اضافه شد و مابقی فضای پتری دیش‌ها تا حجم ۳۰۰۰ میکرولیتر با محیط کشت تازه پر شد. پتری دیش‌ها در چهار بازه زمانی ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در جار هیپوکسی در شرایط بی‌هوازی نسبی انکوبه شدند. سپس محیط کشت هر پتری دیش در پایان بازه زمانی مربوطه تخلیه و سطح داخلی آن با ۲۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سرد و استریل، سه تا پنج مرتبه شستشو داده شد. بعد از این مرحله، به هر پتری دیش، مانند مدل سلول‌های نرمال غیرهیپوکسی، سدیم استات استریل به میزان ۲۰۰۰ میکرولیتر اضافه شد و پتری دیش‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس، محلول روی آن‌ها تخلیه و به یک لوله میکروسانتریفیوژ جهت ارزیابی فعالیت پرتوزائی توسط دستگاه گاما کانتر منتقل شد. از طرف دیگر، مقدار ۲۰۰۰ میکرولیتر سدیم هیدروکساید ۴۰ میلی‌مولار به هر پتری دیش اضافه شد و با حرکت دورانی پتری دیش‌ها به مدت ۶۰ ثانیه لیز سلولی انجام گردید. حاصل لیز سلولی با سمپلر به لوله‌های میکروسانتریفیوژ منتقل شد و میزان فعالیت پرتوزائی آن‌ها با دستگاه گاما کانتر اندازه‌گیری شد.

## یافته‌ها

شکل‌های ۱ و ۲ طیف‌های LC-Mass پپتیدهای سنتز شده را نشان می‌دهد در جدول ۱ نتایج سنجش خصوصیات پپتیدهای سنتز شده، میزان نشاندارسازی شده پپتیدها به‌همراه لگاریتم ضریب توزیع آن‌ها در سیستم آب و روغن نشان داده شده است. نتایج بررسی برداشت سلولی رادیو پپتیدها توسط سلول‌های MCF-7 در شرایط هوازی و بی‌هوازی در زمان‌های مختلف در شکل ۳ آورده شده است.

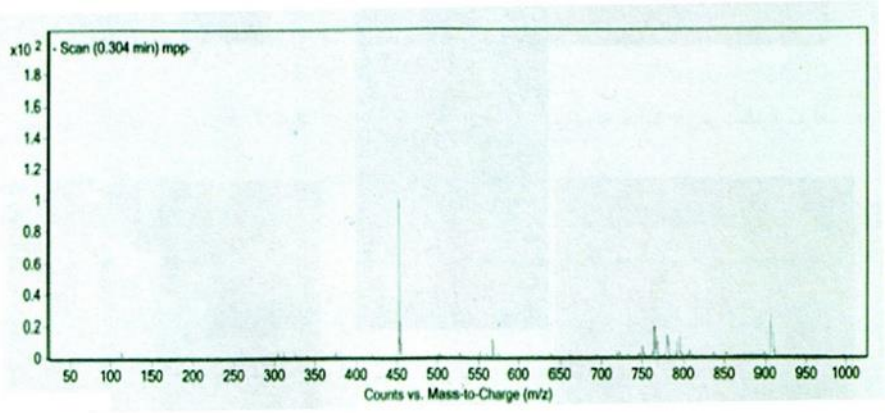
پپتیدهای سنتز شده از پایداری خوبی تا حداقل ۴ ساعت بعد از انکوباسیون با پروتئین‌های پلاسما برخوردار بودند. نتایج LC-MS نمایانگر پایداری پپتیدها بود.



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

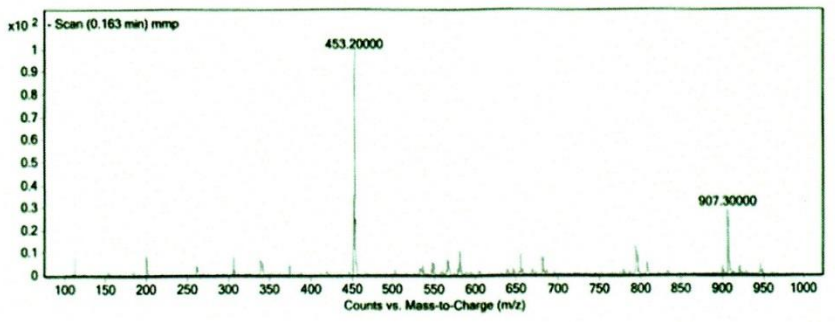
[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

| جدول ۱) خصوصیات فیزیکو شیمیائی پپتیدها و رادیوپپتیدها | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| پپتید | جرم مولکولی | LC-MS جرم طیفی (M-1) | درصد خلوص رادیوشیمیایی | درصد بازده رادیوشیمیایی | (LogP) ضریب توزیع |
| PNBA-SVC | ۴۵۶/۵ | ۴۵۵/۷ | | | |
| PNBA-IAC | ۴۵۴/۵ | ۴۵۳/۲ | | | |
| PNBA-SVC-$^{99m}$Tc | | | ۹۴±۲/۳ | ۹۱±۳/۲ | -۰/۰۰۶۸۹ |
| PNBA-IAC-$^{99m}$Tc | | | ۹۵ ±۱ | ۹۳±۱/۶ | -۰/۰۰۷۴۵ |




شکل ۱) طیف جرمی (LC-Mass) پپتید شماره ۱ (PNBA-SVC)

Fig 1) Mass spectrum of peptide 1 (PNBA-SVC)



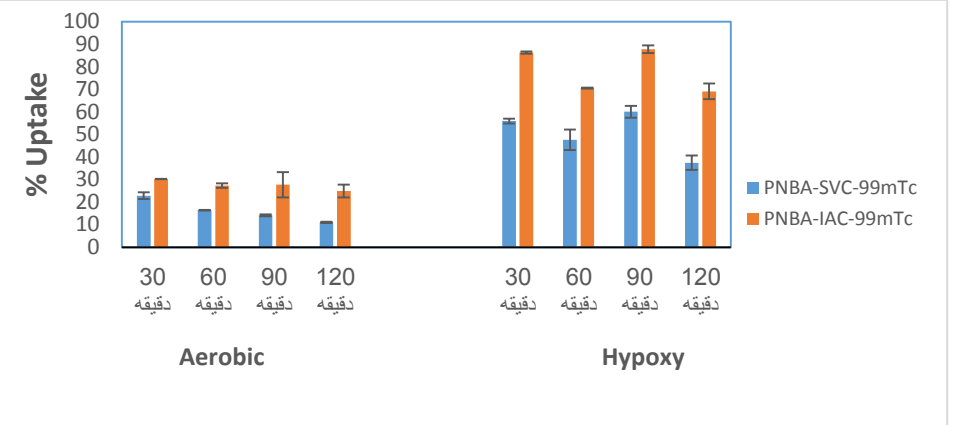

شکل ۲) طیف جرمی (LC-Mass) پپتید شماره ۲ (PNBA-IAC)

Fig 2) Mass spectrum of peptide 2 (PNBA-IAC)



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]




شکل ۳) درصد برداشت رادیو پپتیدها توسط سلول‌های MCF-7 در شرایط هوازی و بی‌هوازی نسبی در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از انکوباسیون

Fig 3) %Uptake of radiopeptides by MCF-7 cells in aerobic and hypoxy conditions at 30, 60, 90, and 120 min post incubation

به منظور تعیین پایداری رادیوپپتیدها در طی زمان‌های مختلف کروماتوگرافی لایه نازک بر روی فاز ساکن سیلیکاژل انجام شد. نتایج حاکی از آن بود که خلوص رادیوشیمیائی برای هر دو رادیوپپتید در محلول نرمال سالین و پلاسمای انسانی در مدت زمان ۶ ساعت تغییر چندانی نمی‌کند.

## بحث

هیپوکسی در نتیجه‌ی اکسیژن‌رسانی ناکافی به بافت ایجاد می‌شود. در بیماری‌هایی همچون ایسکمی‌های قلبی، مغزی و سرطان‌ها هیپوکسی شدن بافت‌ها اتفاق می‌افتد. از متداول‌ترین علت هیپوکسی، ایسکمی‌ها هستند (۱). سلول‌ها و بافت‌های دچار هیپوکسی به شیمی درمانی و رادیوتراپی پاسخ نمی‌دهند (۶-۳)، در نتیجه شناسایی و تشخیص به موقع بافت هیپوکسی به خصوص در این بیماری‌ها بسیار اهمیت دارد زیرا اگر بافت هیپوکسی به موقع تشخیص داده نشود، به مرور نکروزه شده و به بافت مرده تبدیل می‌شود و این حالت بسیار برای ارگان‌های حیاتی بدن خطرناک است (۷). برای تشخیص بافت هیپوکسی به ترکیباتی نیاز است که تمایل ورود به بافت هیپوکسی و ماندگاری کافی در بافت مورد نظر را داشته باشند. در صورتی که این ترکیبات با رادیوایزوتوپ مناسب نشاندار شوند در پزشکی هسته‌ای برای تشخیص بافت هیپوکسی به کار خواهند رفت. هدف این تحقیق معرفی ترکیباتی بود که با تکنسیم نشان‌دار شده و حاوی گروه نیترو برای به دام افتادن در بافت هیپوکسی باشند. به این منظور از تری‌پپتیدهای که نقش شلاتور را برای تکنسیم بازی می‌کنند استفاده شد. به منظور ماندگاری در بافت هیپوکسی از پارانیتروبنزوئیک اسید (به عنوان عامل دارنده گروه نیترو) بهره گرفته شد که به راحتی به توالی اسیدهای آمینه متصل می‌شود. البته در کارهای مشابه گذشته از پپتیدها در اتصال به ترکیبات نیترو ایمیدازولی به عنوان عامل دارنده گروه نیترو استفاده شده است (۱۸). همچنین از پپتید های نشاندار شده با تکنسیم $^{99m}$ در تصویر برداری از ترومبوز استفاده شده است (۱۹ و ۲۰). برای سنتز پپتیدها از روش سنتز در فاز جامد (SPPS) با متد Fmoc استفاده شد. در این متد انتهای آمینی اسیدهای آمینه توسط یک عامل Fmoc پوشیده شده است تا به این ترتیب از واکنش گروه آمینی جلوگیری شود، که در مرحله‌ی اتصال اسیدهای آمینه این عامل



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

توسط پیپرازین برداشته شده تا اسید آمینه‌ی جدید به اسید آمینه قبلی متصل شود. طبق روش SPPS برای سنتز پپتید به یک پایه اولیه نیاز است که اسید آمینه‌ها یک به یک روی آن سوار شوند. به این منظور در این پژوهش از رزین ونگ استفاده شد که آمینو اسید اول با پیوند استری به رزین متصل می‌شود. آمینو اسیدهای بعدی از طریق عامل آلفا کربوکسیل خود به گروه آمین آزاد (فاقد عامل محافظ) مربوط به آمینو اسید متصل به رزین با پیوند آمیدی متصل می‌گردد. ترکیب پارانیتروبنزوئیک اسید بمانند یک آمینو اسید می‌تواند از طریق گروه کربوکسیل خود به آمین آزاد پپتید سوار شده بر رزین متصل شود. البته در اینجا نیازی به مرحله بعدی محافظت برداری نیست. در انتها، پپتید ساخته شده که حامل گروه نیترو است توسط تری فلوئورو استیک اسید از رزین جدا می‌شود که پس از صاف شدن، محلول به‌دست آمده در اتر سرد، رسوب پپتید مربوطه را به‌دست می‌دهد. لازم به تذکر است که تری‌فلوئورو استیک اسید حاوی مواد کمکی به دام‌انداز (scavengers) است تا عوامل محافظت کننده گروه‌های عاملی پپتید، پس از شکسته شدن از گروه عاملی خود به دام افتاده و به نقاط حساس دیگر پپتید حمله نکنند.

پپتیدهای سنتز شده با $^{99m}Tc$ نشاندار شدند. در این نشاندارسازی به یون تکنسیم با ساختار [Tc=O] نیاز است تا با نیتروژن و گوگرد موجود در پپتیدها کمپلکس تشکیل دهد. در ساختار این پپتیدها به دلیل وجود اسیدآمینه سیستئین، گوگرد نیز وجود دارد. گوگرد لیگاند نرم است و برقراری پیوند آن با تکنسیم زمان بر است، گرچه در صورت تشکیل پیوند، گوگرد می‌تواند کمپلکسی مستحکم و قوی با تکنسیم برقرارکند. زمان‌بر بودن تشکیل کمپلکس، خطر تبدیل یون پرتکنتات $TcO_4^-$ آزاد به $TcO_2$ را دارد که کارایی لازم را در تشکیل کمپلکس ندارد. بنابراین برای جلوگیری از این تبدیل باید از یک شلاته کننده واسطه با عملکرد سریع در محیط واکنش استفاده شود که بدین منظور از محلول دی سدیم تارتارات به عنوان شلاتور استفاده شد. برای جلوگیری از تغییرات pH محیط، بافر آمونیوم استات به محیط واکنش اضافه شد. برای نشان‌دارسازی هر ترکیبی با تکنسیم نیاز به کلرید قلع ($SnCl_2$) در محیط واکنش است. نقش این ماده احیا پرتکنتات و آماده‌سازی آن برای انجام واکنش است. به این ترتیب که قلع با عدد اکسیداسیون ۲+ وارد محیط واکنش شده و در مجاورت پرتکنتات تبدیل به $Sn^{4+}$ می‌شود. دو الکترون آزاد شده از قلع به پرتکنتات داده شده و در نتیجه پرنکتات احیاء شده می‌تواند با تارتارات به صورت موقت واکنش داده و تشکیل کمپلکس دهد. این واکنش ادامه می‌یابد، تا زمانی که یک لیگاند قوی‌تر وارد محیط واکنش شود. با ورود لیگاند قوی‌تر مانند گوگرد (که در ساختار پپتیدهای مورد نظر وجود دارد ) سدیم تارتارات محیط را ترک کرده و تکنسیم احیا شده به گوگرد متصل می‌شود.

بررسی خلوص رادیوشیمیایی پپتیدهای نشان‌دار شده، به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شد. در دو تانک TLC، که یکی حاوی اتیل متیل کتون (EMK) و تانک دیگر حاوی استونیتریل و آب به نسبت مساوی بودند، دو ورقه TLC لکه‌گذاری شده، قرار گرفت. بعد از بالا رفتن نمونه‌ها، ورقه‌ها از تانک خارج شد و به نسبت $\frac{1}{3}$، $\frac{2}{3}$ بریده شد و اکتیویته هر قسمت جداگانه توسط دستگاه گاما کانتر اندازه‌گیری شد. حلال EMK، آن بخشی از نمونه را که حاوی $TcO_4^-$ می‌باشد، باخود بالا می‌برد. بنابراین $\frac{2}{3}$ بالایی ورقه مؤید $TcO_4^-$ موجود در نمونه است و $\frac{1}{3}$ پایینی



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

ورقه مخلوطی از پپتید نشاندار شده با $TcO_2$ می‌باشد. پس آنچه با استفاده از ورقه مربوط به حلال EMK قابل محاسبه است ، درصد اکتیویته $TcO_4^-$ به عنوان ناخالصی می‌باشد. حلال موجود در تانک آب و استونیتریل، پپتید نشاندار شده را به همراه $TcO_4^-$ بالا می‌برد و آنچه که در پایین ورقه باقی می‌ماند، $TcO_2$ می‌باشد. با استفاده از ورقه مربوط به این تانک می‌توان درصد $TcO_2$ را به عنوان ناخالصی محاسبه کرد. در نهایت درصد نشاندار سازی پپتید برابر است با:

درصد نشاندار سازی =۱۰۰-(%$TcO_4^-$ + %$TcO_2$)

هر چه مجموع درصد $TcO_4^-$ و $TcO_2$ کمتر باشد، درصد نشاندار شدن پپتید بیشتر و خلوص رادیوشیمیایی آن بالاتر است.

برای بررسی Log P در مورد پپتیدها، انحلال‌پذیری پپتید در یک فاز آب دوست با انحلال‌پذیری آن در یک فاز آب گریز مقایسه می‌شود. در این روش، فاز آب دوست عموماً سرم فیزیولوژیک (سدیم کلراید ۰/۹ درصد در آب مقطر) و فاز آب گریز اکتانول نرمال (n-Octanol) می‌باشد. نسبت حجمی مصرفی از این دو حلال باید با هم برابر باشد تا مقایسه دقیق و درستی انجام شود. نتایج Log P به این ترتیب تفسیر می‌شود، که اگر عدد حاصل از نظر ریاضی عددی منفی باشد، پپتید هیدروفیل است و تمایلش به فاز آبی بیشتر است و هر چه این عدد منفی‌تر باشد، هیدروفیلیسیته پپتید هم بیشتر است. اگر عدد حاصل از نسبت مربوطه مثبت باشد، پپتید لیپوفیل است و تمایلش به فاز آلی بیشتر است و هر چه این عدد مثبت‌تر باشد، پپتید لیپوفیل‌تر خواهد بود. از آنجا که هر سلول توسط یک غشا دو لایه چربی پوشیده شده است و بیشتر ساختار غشاء سلول از فسفولیپیدها تشکیل شده، بنابراین هر چه یک ترکیب لیپوفیل‌تر باشد، راحت‌تر از غشاء سلولی عبور می‌کند و وارد سلول می‌شود. به عبارتی، احتمال عبور یک پپتید لیپوفیل از غشاء سلولی و ورود آن به سلول به مراتب بیشتر از ترکیبات هیدروفیل است. اگر لیپوفیلیسیته خیلی زیاد باشد، ترکیب در داخل غشاء به دام افتاده و وارد فضای داخل سلول نمی‌شود. بنابراین تعیین مقدار Log P از این نظر اهمیت دارد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که Log P نزدیک صفر برای ترکیباتی که به عنوان تصویربرداری بافت هیپوکسی مصرف می‌شوند، ایده‌آل است (۱۸). به عنوان مثال، Log P ترکیب FMISO برابر ۰/۴۱ بود که برای ورود به بافت هیپوکسی بسیار مناسب بود (۲۱).

مقادیر LogP پپتیدهای نشاندار سنتز شده حاضر گرچه منفی بودند ولی عدد به‌دست آمده نزدیک به صفر است، بنابراین احتمال ورود پپتیدهای سنتز شده به سلول هیپوکسی وجود دارد. در تحقیق حاضر، مطالعات جذب سلولی پپتیدهای نشاندار شده در دو شرایط هوازی (نرمال) و غیرهوازی (هیپوکسی) انجام شد تا نحوه عملکرد سلول‌ها در شرایط متفاوت در برابر این ترکیبات مورد مقایسه قرار گیرد. بررسی‌های برداشت سلولی پپتید ۱ در شرایط هوازی نشان داد که در ۳۰ دقیقه اول میزان برداشت پپتید به داخل سلول‌ها حدود ۲۳ درصد بود (شکل ۳). با گذر زمان طی ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه میزان فعالیت پرتوزائی در سلول‌ها افت کرد و در مقابل میزان فعالیت پرتوزائی در فضای خارج سلولی بالا رفت. این بدین معنی است که در شرایط هوازی، پپتید حاوی گروه نیترو پس از ورود به سلول می‌تواند احیا شود و به مرور زمان در سلول اکسید گردد و از سلول خارج گردد. بنابراین ماندگاری پپتید در شرایط هوازی در داخل سلول پائین است. در سلول‌های هیپوکسی، میزان پپتید ۱ در ۳۰ دقیقه اول حدود ۵۵ درصد بود که با گذشت زمان از مقدار آن کاسته شد ولی کماکان نسبت به شرایط هوازی



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

مقدار آن در سلول‌ها بیشتر بود (شکل ۳). توضیح اینکه در شرایط هیپوکسی بافت، روند جذب سلولی پپتید تا ۳۰ دقیقه اول سریع بوده و سپس روند کند دفع پپتید از سلول تا دقیقه ۶۰ واقع شده و جذب مجدد با شدت بیشتر تا دقیقه ۹۰ صورت گرفته و سپس دفع بعدی از سلول‌ها واقع شده که به سمت ۱۲۰ دقیقه، روند نزولی در بقای پپتید در سلول ادامه یافته است. به نظر می‌رسد که روند دو مرحله‌ای جذب بخاطر مهیا شدن تدریجی و تشدید محیط هیپوکسی در سلول ایجاد شده باشد. در مورد پپتید ۲ در ورود به سلول‌ها در شرایط هوازی و بی‌هوازی روند مانند پپتید ۱ است با این تفاوت که میزان برداشت کلی پپتید ۲ توسط سلول در شرایط هیپوکسی نسبت به پپتید ۱ بالاتر می‌باشد، گرچه در مقایسه با شرایط نرمال، میزان برداشت نسبی پپتید ۲ کمتر از پپتید ۱ توسط سلول است (شکل ۳ ملاحظه شود). تحقیق حاضر نشان می‌دهد که پپتیدهای سنتز شده‌ی حامل پارانیتروبنزوئیک اسید با داشتن گروه نیترو در بخش پارای حلقه بنزنی می‌تواند مشابه پپتیدهای سنتز شده حامل ترکیبات نیترو ایمیدازولی (۱۸) عمل کرده و گروه نیتروی آزاد آن قابل دسترس برای احیا شدن باشد. البته در مقایسه با مطالعه مشابه گذشته (۱۸) که در آن، میزان برداشت پپتید توسط سلول در طول زمان ۱۲۰ دقیقه در شرایط هیپوکسی دو برابر شرایط نرمال گزارش شده است، در تحقیق حاضر در شرایط مشابه، میزان برداشت سلولی پپتیدها در مورد پپتید ۱ و ۲ در مقایسه شرایط هیپوکسی با شرایط نرمال به ترتیب ۴ و ۲/۸ برابر است که به مراتب عملکرد بهتری را نشان می‌دهد.

به‌طور کلی می‌توان گفت که بافت هیپوکسی در مقایسه با بافت عادی (نرمال) می‌تواند ترکیب نشاندار حاوی گروه نیترو را درون خود به دام اندازد و مدتی نگه دارد. این مدت می‌تواند برای شناخت بافت هیپوکسی جهت ردیابی و تصویربرداری مناسب باشد. لازم به ذکر است که در این آزمایش‌های برداشت سلولی پپتیدها در شرایط هیپوکسی، به دلیل باز شدن مکرر درب جار، احتمال ورود اکسیژن به فضای داخل جار و نتیجتاً تضعیف و تغییر شرایط هیپوکسی وجود دارد که این خود می‌تواند در روند و نتایج آزمایش‌ها خطا ایجاد کند.

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۲ پپتید که در قسمت انتهای آمینه آن‌ها، پارانیتروبنزوئیک اسید متصل بود، طراحی و سنتز شدند. پپتیدها با استفاده از $^{99m}Tc$ نشاندار شده و خلوص رادیو شیمیایی، بازده نشاندارسازی، پایداری، Log P و برداشت آن‌ها توسط سلول‌های MCF-7 در شرایط هوازی و بی‌هوازی بررسی شد. نشاندارسازی پپتیدها با بازده و خلوص بالایی به‌دست آمد. پپتیدها به علت داشتن Log P در حد صفر به نظر می‌رسد که به خوبی در بافت هیپوکسی به دام می‌افتند و تا زمان ۱۲۰ دقیقه می‌توانند در سلول‌ها بقا داشته باشند که این مدت زمان برای شناسائی، ردیابی و تصویربرداری از بافت مشکوک به سرطان می‌تواند کافی باشد. تأیید این مسئله نیازمند مطالعه با تعداد پپتیدهای بیشتر و لیپوفیل‌تر در ورود به انواع سلول‌های سرطانی در شرایط هوازی و هیپوکسی می‌باشد.

## سپاس و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه دکتری عمومی داروسازی خانم مهتاب محمدپور است. این کار تحقیقاتی تحت حمایت مالی هیچ سازمانی قرار نگرفته است.

## تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.



[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

## References:


1.Mason RP, Zhao D, Pacheco-Torres J, et al. Multimodality Imaging of Hypoxia in Preclinical Settings. Q J Nucl Med Mol Imaging 2010; 54(3): 259-80.

2.Dhani N, Fyles A, Hedley D, et al. The Clinical Significance of Hypoxia in Human Cancers. Semin Nucl Med 2015; 45(2): 110-21.

3.Mees G, Dierckx R, Vangestel C, et al. Molecular Imaging of Hypoxia with Radiolabelled Agents. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2009; 36(10): 1674-86.

4.Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular Imaging of Hypoxia. J Nucl Med 2008; 49: 129S-48S.

5.Span PN, Bussink J. Biology of Hypoxia. Semin Nucl Med 2015; 45(2): 101-9.

6.Langen KJ, Eschmann SM. Correlative Imaging of Hypoxia and Angiogenesis. J Nucl Med 2008; 49(4): 515-6.

7.Linder KE, Chan Y-W, Cyr JE, et al. TcO (PnA. O-1-(2-nitroimidazole))[BMS-181321], A New Technetium-containing Nitroimidazole Complex for Imaging Hypoxia: Synthesis, Characterization, and Xanthine Oxidase-catalyzed Reduction .J Med Chem 1994; 37(1): 9-17.

8.Nunn A, Linder K, Strauss HW. Nitroimidazoles and Imaging Hypoxia. Eur J Nucl Med 1995; 22(3): 265-80.

9.Le QT, Courter D. Clinical Biomarkers for Hypoxia Targeting. Cancer Metastasis Rev 2008; 27(3): 351-62.

10.Varia MA, Calkins-Adams DP, Rinker LH, et al. Pimonidazole: A Novel Hypoxia Marker for Complementary Study of Tumor Hypoxia and Cell Proliferation in Cervical Carcinoma. Gynecol Oncol 1998; 71(2): 270-7.

11.Melo T, Tunggal JK, Ballinger JR, et al. Flux Through Multicellular Layers of A Technetium-99m-Nitroimidazole for Imaging Hypoxia. Cancer Biother Radiopharm 2002; 17(5): 515-26.

12. Rezaeianpour S, Mosayebnia M, Bozorgi AH, et al. Design, Synthesis and Radiolabeling of Peptide GPRPILE with $^{18}$FDG as Fibrin Imaging Agent for Thrombosis Detection. Iran South Med J 2018; 21(3): 228-41.

13.Liu S, Edwards DS. 99mTc-labeled Small Peptides As Diagnostic Radiopharmaceuticals. Chem Rev 1999; 99(9): 2235-68.

14.Klimentzou P, Beck A, Varvarigou A, et al. Solid-phase Synthesis of a Peptide Derivative of Thymosin alpha1 and Initial Studies on its 99mTc-Radiolabelling. Chem Biol Drug Des 2007; 70: 40-6.

15.Couture F, Levesque C, Dumulon-Perreault V, et al. PACE4-based Molecular Targeting of Prostate Cancer Using An Engineered 64 Cu-radiolabeled Peptide Inhibitor. Neoplasia 2014; 16(8): 634-43.

16.Karachaliou CE, Liolios C, Triantis C, et al. Specific in Vitro Binding of Prothymosin alpha on Human Neutrophils. Int J Pharm 2015; 486(1-2):1-12.

17.Hausner SH, Bauer N, Hu LY, et al. The Effect of Bi-Terminal PEGylation of an Integrin αvβ6–Targeted 18F Peptide on Pharmacokinetics and Tumor Uptake. J Nucl Med 2015; 56(5): 784-90.

18.Zhang X, Su ZF, Ballinger JR, et al. Targeting Hypoxia in Tumors Using 2-nitroimidazoles with Peptidic Chelators for Technetium-99m: Effect of Lipophilicity. Bioconjug Chem 2000; 11: 401-7.

19. Rezaeianpour S, Bozorgi AH, Moghimi A, et al. Synthesis and Biological Evaluation of Cyclic [99mTc]-HYNIC-CGPRPPC as a Fibrin-Binding Peptide for Molecular Imaging of Thrombosis and Its Comparison with [99mTc]-HYNIC-GPRPP. Mol Imaging Biol 2017; 19(2):256-64.

20.Mosayebnia M, Hajiramezanali M, Shahhosseini S, et al. Docking, synthesis, in-vitro evaluation, and optimization of reaction conditions for direct radiolabeling of CGPRPPC with technetium-99m through the GAGG sequence. Nuclear Medicine Communications 2018; 39(11): 976-982.

21.Rasey JS, Koh W-J, Grierson JR, et al. Radiolabeled Fluoromisonidazole As Imaging Agent for Tumor Hypoxia. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 17(5): 985-91.




[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]

*Original Article*

# Design, Synthesis and Labeling of Tripeptide Derivatives with $^{99m}$Tc as Hypoxia Imaging Agents

*MH. Houshdar Tehrnai (PhD)*[1*], *M. Mohammadpoor (Pharm D)*[2], *S. Shahhosseini (PhD)*[1]

[1] *Phrmaceutical Chemistry& Neuclear Medicine Dept, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
[2] *Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

**(Received 1 Jan, 2019 Accepted 13 Mar, 2019)**

***Abstract***

**Background:** Many diseases, including cancer, ischemia and tumors show degrees of tissue hypoxia. Therefore, it is useful to detect tissue hypoxia with compounds that can penetrate and remain in hypoxic cells in order to diagnose cancer at early stages. Peptides with low molecular weight, susceptible to redox environment, with easier penetration into tissues and low antigenic characteristics are good candidates, as compared to antibodies and proteins. Therefore, radiolabeling small lipophilic peptides containing a nitro group with $^{99m}$Tc to enter and remain in the hypoxic cell for imaging hypoxic tissue is a good strategy for earlier detection of tumors, which leads to more effective and satisfactory treatment.

**Materials and Methods:** In this study, some tripeptides were synthesized with added para nitro benzoic acid (PNBA) group at their N-terminal using solid phase peptide synthesis (SPPS) method with Fmoc strategy using Wang resin. The peptides were labeled with $^{99m}$Tc and their characterizations were determined using chromatographic techniques and partition coefficient experiments. A hypoxia Jar system was used to examine cellular uptake of the labeled peptides exposed to MCF-7 cells in normal and hypoxic conditions for 30 to 120 min.

**Results:** Synthesis of the peptides resulted in good yields (70% to 78%). The synthesized peptides and radiopeptides were stable in normal saline and human plasma for at least 4 h and 6 h, respectively. Radiochemical purity (RCP) of the synthesized labeled peptides was ≈94% with lipophilicity (Log P) ≈-0.006. Furthermore, labeled peptides exposed to MCF-7 cells could remain in hypoxic cells longer than those in normal cells.

**Conclusion:** Considering the results obtained in this study, the peptide derivatives labeled with $^{99m}$Tc, appear to be appropriate agents for the detection and imaging of hypoxic tissues.

**Keywords:** Solid phase synthesis, Peptide, Radiolabeling, $^{99m}$Tc, Hypoxia

©Iran South Med J.All right sreserved

*Cite this article as: Houshdar Tehrnai MH, Mohammadpoor M, Shahhosseini S. Design, Synthesis and Labeling of Tripeptide Derivatives with $^{99m}$Tc as Hypoxia Imaging Agents. Iran South Med J 2019;22(3):160-173*

Copyright © 2019 Houshdar Tehrnai, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[*] *Address for correspondence:* Phrmaceutical Chemistry& Neuclear Medicine Dept., School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. E.mail: m_houshdar@sbmu.ac.ir
[*]ORCID: 0000-0001-9820-4156

**Website: http://bpums.ac.ir**
**Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir**

[ Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-14 ]

[ DOI: 10.29252/ismj.22.3.160 ]