تولید کپسول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴ جهت تشخیص هلیکوباکتر پیلوری

INC29-1220

عبدالناصر توکلی، امیر مهدی زاده، حسین موحد، مهدی دهقانی، وحید خسرونژاد، رسول صالحی مرتب، محمدرضا داورپناه

شرکت پارس ایزوتوپ،۱۴۳۹۹۵۵۴۱۶، تهران، ایران.

چکیده:

هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین باکتری‌هایی است که عامل اصلی بیماری‌هایی مانند زخم معده و انواع سرطان‌های گوارشی است. روش‌های مختلفی جهت تشخیص این باکتری وجود دارد اما یکی از روش‌های نوین و مؤثر در تشخیص آن استفاده از رادیوداروی کپسول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴ است. این کپسول با اکتیویته ۱ میکروکوری و به‌صورت تک دز مصرف می‌شود. پس از ورود به معده و در صورت وجود این باکتری، کربن-۱۴ اوره به دو ترکیب کربن-۱۴ دی‌اکسید و آمونیاک تبدیل می‌گردد. کربن-۱۴ دی‌اکسید تولید شده از طریق جریان خون وارد ریه شده و از طریق بازدم از بدن فرد خارج می‌گردد. با جمع‌آوری هوای خارج شده در یک بالن و شمارش آن وجود یا عدم وجود باکتری مشخص خواهد شد. خلوص رادیوشیمیایی این رادیودارو طبق استاندارد USP باید بیش از ۹۰ درصد باشد که براساس آزمایشات انجام‌شده خلوص رادیوشیمیایی این رادیودارو به‌طور میانگین ۹۷ درصد بوده است.

کلیدواژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، کپسول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴، خلوص رادیوشیمیایی، استاندارد USP.

Production of ^{14}C-Urea-Containing Capsule for Detecting Helicobacter Pylori

A. N. Tavakoli, A. Mehdizadeh*, H. Movahed, M. Dehghan, V. Khosronejad, R. Salehi Moratab, M. R. Davarpanah

Pars Isotope Company, 1439955416, Tehran, Iran.

Abstract:

Helicobacter pylori is one of the most common bacterial infection, may lead to ulcers and gastric cancer. There are some diagnosing procedures but using urea-containing capsule labelled with Carbon-14 is new and effective. The capsule is containing 1µCi of ^{14}C-urea and used as a single dose. When it comes into contact with the bacteria in the patient's stomach, it is broken down into ^{14}C-carbon dioxide and ammonia. The carbon dioxide is carried to the patient's lungs through the bloodstream and is breathed out. A breath sample is collected in a balloon, then analyzed to measure the amount of the ^{14}C-carbon dioxide. According to USP standard the radiochemical purity must be more than 90 percent. Our tests show that the radiochemical purity was 97 percent in average.

Keywords: Helicobacter Pylori, ^{14}C-Urea-Containing Capsule, Radiochemical Purity, USP standard.

۱. مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری[1] یکی از شایع‌ترین باکتری‌هایی است که بیش از نیمی از مردم جهان را مبتلا به عفونت کرده است[۱]. این باکتری عامل اصلی بیماری‌هایی مانند زخم معده و ناراحتی‌های معده است که می‌تواند باعث بروز برخی از انواع سرطان‌های گوارشی و معده شود[۲].

هلیکوباکتر پیلوری نوعی باکتری مارپیچی شکل است که می‌تواند به‌صورت کروی نیز تغییر شکل پیدا کند. هر دو شکل این باکتری بیماری‌زا و غیرقابل کشت در محیط آزمایشگاهی است[۲]. سه نوع آزمایش برای شناسایی این نوع باکتری وجود دارد که عبارت‌اند از:

۱- نمونه‌برداری و آزمایش یک تکه از بافت معده:

در این روش یک تکه خیلی کوچکی از معده به‌وسیله آندوسکوپی برداشته می‌شود. تکه برداشته شده در یک محلول مخصوص قرار می‌گیرد که در صورت وجود این باکتری رنگ آن تغییر می‌کند. مشکل این آزمایش این است که برای انجام آن باید اقدام به آندوسکوپی نمود.

۲- آزمایش آنتی‌بادی خون:

هلیکوباکتر پیلوری همانند سایر عفونت‌ها باعث تولید آنتی‌بادی‌های خاصی در خون می‌گردد. با نمونه‌برداری از خون و شناسایی این نوع آنتی‌بادی وجود این باکتری تائید می‌گردد. هنگامی‌که این آنتی‌بادی‌ها در بدن تولید شوند، ممکن است بعد از اتمام عفونت در بدن همچنان باقی بمانند. بنابراین این آزمایش تنها برای افرادی مفید است که تاکنون اقدام به درمان هلیکوباکتر پیلوری نکرده‌اند و نمی‌توان بیش از یک‌بار از این آزمایش استفاده نمود.

۳- تست تنفسی اوره:

یکی از روش‌های نوین، مؤثر و ارزان در تشخیص این نوع باکتری، استفاده از اوره نشاندارسازی شده با رادیوایزوتوپ کربن-۱۴است. این رادیودارو برای تشخیص بیماری هلیکوباکتر پیلوری به‌صورت محلول و کپسول ژلاتینی در دنیا مورداستفاده قرار می‌گیرد. شکل کپسول آن با اکتیویته ۱ میکروکوری و به‌صورت تک دز استفاده می‌شود. پس از ورود کپسول به معده بیمار بعد از گذشت ۳ دقیقه در آن حل می‌شود. اگر هلیکوباکتر پیلوری در بدن فرد بیمار باشد ترکیب این رادیودارو توسط باکتری شکسته شده و به دو ترکیب کربن-۱۴ دی‌اکسید و آمونیاک تبدیل می‌شود. کربن-۱۴ دی‌اکسید تولید شده به‌وسیله جریان خون به ریه فرد منتقل شده و از طریق باز دم از بدن او خارج می‌شود. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه از دریافت کپسول توسط شخص بازدم او درون بالن مخصوصی جمع‌آوری می‌گردد. هوای درون بالن توسط کیت مخصوصی جهت شمارش میزان اکتیویته کربن-۱۴ اندازه‌گیری می‌شود. در صورت وجود کربن-۱۴ در بازدم شخص، فرد بیمار مبتلا به هلیکوباکتر پیلوری است در غیر این صورت اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴به‌راحتی وارد کلیه شده و ازآنجا از طریق ادرار از بدن شخص بیمار خارج می‌شود[۳].

رادیوایزوتوپ کربن-۱۴ با نیمه‌عمر ۵۷۳۰ سال طبق رابطه زیر به عنصر پایدار نیتروژن-۱۴ واپاشی می‌کند:

$$^{14}_{6}C \rightarrow ^{14}_{7}N + e^{-} + 156.5\ keV$$

این رادیوایزوتوپ بتازای خالص است که بیشینه انرژی بتای آن برابر keV ۱۵۶٫۵ می‌باشد. ذره بتای حاصل از این واپاشی انرژی بسیار پایینی دارد که بیشترین مسافت طی شده توسط آن در هوا ۲۲ سانتی‌متر و در بافت نرم ۰٫۲۷ میلی‌متر است[۴].

شرکت پارس ایزوتوپ تنها تولیدکننده رادیودارو در کشور موفق شده است که برای اولین بار در ایران رادیوداروی کپسول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴را تولید و عرضه کند. با استفاده از این رادیودارو مشکلات ناشی از روش‌های تشخیصی دیگر همانند آندوسکوپی کاملاً برطرف شده است.

1- Helicobacter pylori

۲. روش کار

رادیوداروی اوره نشاندار سازی شده با کربن-۱۴به دو شکل محلول و کپسول در جهان موردا ستفاده قرار می‌گیرد. این رادیودارو به شکل کپسول برای اولین بار در ایران تولید و بهره‌برداری شده است. در تولید این کپسول از مواد و تجهیزات مختلفی استفاده‌شده است که در ادامه به توضیح آن‌ها می‌پردازیم.

در این پژوهش از کپسول‌های ژلاتینی با سایز ۱ استفاده‌شده است. طبق مطالعات صورت گرفته می‌توان از ترکیب ماده شیمیایی شوگر اسفیر[1] (شرکت سازنده: Colorcon) و فلورسین سدیم[2] (شرکت سازنده: Sigma Aldrich) برای پر کردن کپسول‌ها استفاده کرد[۵]. برای اضافه کردن پودر اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴(تولیدکننده: INM روسیه) به کپسول‌های ژلاتینی پر شده می‌بایست در ابتدا این پودر را به‌صورت محلول درآورد. طبق مطالعات و تحقیقات صورت گرفته می‌توان از محلول اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار به‌عنوان حلال برای پودر اوره نشاندار سازی شده با کربن-۱۴استفاده کرد[۵]. جهت افزودن محلول رادیواکتیو موردنظر به کپسول‌های ژلاتینی پر شده باید به دو نکته توجه ویژه داشت. نکته اول اینکه طبق استاندارد USP[3] اکتیویته هر کپسول باید بین دو عدد ۰/۹ و ۱/۱ میکروکوری باشد. نکته دوم اینکه براساس همین استاندارد تاریخ انقضای کپسول اوره نشاندار سازی شده با کربن-۱۴دو سال در نظر گرفته شده است بنابراین حجم محلول رادیواکتیو افزوده شده باید به‌گونه‌ای باشد که باعث تغییر شکل کپسول در زمان‌های مختلف نگردد. بنابراین برای حل کردن پودر کرین-۱۴ نشاندارسازی شده با اوره در اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار باید به این دو نکته مهم توجه ویژه داشت.

در روزهای مختلف تعدادی کپسول ژلاتینی با مواد شیمیایی ذکر شده جهت تعیین میزان مناسبی از حجم محلول که می‌تواند به هر یک از کپسول‌ها اضافه گردد به‌گونه‌ای که باعث تغییر شکل آن‌ها نشود، آماده گردید. طبق آزمایشات صورت گرفته حجم مناسب محلول مقدار ۱۰ میکرولیتر تعیین گردید. نتایج مربوط به این آزمایشات در ادامه آورده شده است.

برای تعیین مقدار وزن مورد نیاز از پودر اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴به‌گونه‌ای که اکتیویته آن معادل ۱ میکروکوری باشد، می‌توان از رابطه ۱ استفاده کرد.

$$W_{^{14}C} = \frac{A_{^{14}C}}{S_{^{14}C}} \qquad (۱)$$

در رابطه بالا $W_{^{14}C}$ مقدار وزن موردنیاز، $A_{^{14}C}$ اکتیویته و $S_{^{14}C}$ اکتیویته ویژه پودر اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴می‌باشد که طبق اطلاعات درج شده بر روی ویال حاوی این پودر رادیواکتیو، اکتیویته ویژه آن برابر با ۰/۹۲ Ci/g است. با استفاده از رابطه ۱ و طبق محاسبات وزن مورد نیاز از پودر اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴، ۱/۱ میکروگرم خواهد بود. با توجه به اینکه عدد مذکور مقدار بسیار اندکی است و توزین آن بسیار دشوار است، مقدار ۱،۱ میلی‌گرم جایگزین آن گردید که اکتیویته‌ای معادل ۱ میلی کوری دارد. حال می‌بایست ویال حاوی ۱/۱ میلی‌گرم پودر اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴به‌وسیله حلال اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار حل گردد. حجم محلول نهایی باید به‌گونه‌ای باشد که هر ۱۰ میکرولیتر از آن اکتیویته‌ای معادل ۱ میکروکوری داشته باشد. بنابراین غلظت اکتیویته محلول نهایی می‌بایست برابر با ۰/۱ Ci/L باشد. طبق رابطه ۲ می‌توان حجم نهایی محلول رادیواکتیو را محاسبه کرد.

$$V_{^{14}C} = \frac{A_{^{14}C}}{C_{^{14}C}} \qquad (۲)$$

1- Sugar Sphere
2- Sodium Fluorescein
3- United States Pharmacopeia

در رابطه بالا V_{14C} حجم نهایی محلول رادیواکتیو، A_{14C} اکتیویته ویال حاوی ۱/۱ میلی‌گرم پودر اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴و C_{14C} غلظت اکتیویته محلول نهایی است. طبق محاسبات انجام شده حجم نهایی برابر ۱۰ سی‌سی خواهد بود.

پس از افزودن مقدار ۱۰ سی‌سی محلول اسید سیتریک ۰/۰۵ مولار به ویال حاوی ۱/۱ میلی‌گرم پودر اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴، نمونه‌ای جهت بررسی میزان خلوص رادیوشیمیایی این محلول رادیواکتیو به واحد کنترل کیفیت تحویل داده شد. روش بررسی میزان خلوص رادیوشیمیایی براساس استاندارد USP به شرح زیر است:

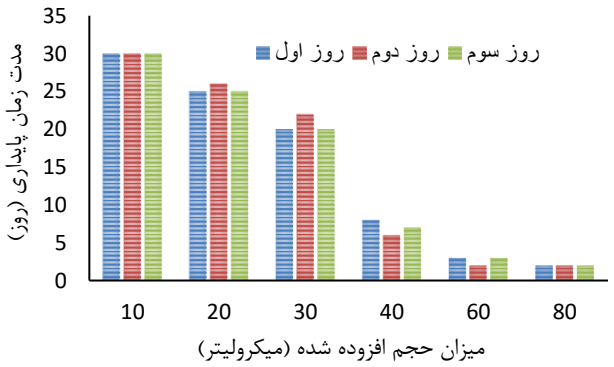
در ابتدا مقدار ۲ میکروکوری (۲۰ میکرولیتر) از محلول رادیواکتیو نهایی آماده شده به‌وسیله تقسیم کننده دستی (مدل Eppendorf) به ۸ سی‌سی از محلول متانول اضافه گردید. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر از این محلول جدید به‌وسیله تقسیم کننده دستی برداشته و به‌صورت لکه‌گذاری بر روی کاغذ مخصوص TLC[1] با طول ۲۰ سانتی‌متر گذاشته شد. پس‌ازآن کاغذ لکه‌گذاری شده به‌صورت عمودی درون تانکی حاوی محلول ان - بوتانول[2] اشباع شده قرار گرفت. کاغذ لکه‌گذاری شده باید به‌گونه‌ای قرار گیرد که محلول درون تانک آلوده به مواد رادیواکتیو موجود بر روی کاغذ نشود. حال پس از گذشت مدت‌زمان مناسب، محلول درون تانک از روی کاغذ لکه‌گذاری شده عبور کرده و به سمت بالا حرکت می‌کند. هنگامی‌که ارتفاع محلول به سطح مناسبی از کاغذ لکه‌گذاری شده رسید، آن را از درون تانک خارج کرده و با استفاده از آشکارساز مناسب تمامی طول کاغذ لکه‌گذاری شده را شمارش می‌کنیم. در صورت وجود ناخالصی رادیوشیمیایی، علاوه بر محل لکه‌گذاری شده در نقاط دیگری از کاغذ نیز قله‌هایی مربوط به شمارش اکتیویته وجود خواهد داشت. طبق استاندارد USP میزان خلوص رادیوشیمیایی باید بیش از ۹۰ درصد باشد. با استفاده از رابطه ۳ می‌توان درصد خلوص رادیوشیمیایی نمونه موردنظر را محاسبه کرد. نتایج مربوط به این آزمایش در ادامه آورده شده است.

$$\%\ \text{Radiochemical Purity} = \frac{\text{Counts of } ^{14}\text{C}}{\text{Total Counts}} \qquad (۳)$$

پس از دریافت تأییدیه خلوص رادیوشیمیایی محلول رادیواکتیو نهایی از واحد کنترل کیفیت، می‌توان با استفاده از تقسیم کننده دستی مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول را به هرکدام از کپسول‌های ژلاتینی پر شده اضافه و برای مراکز درخواست‌کننده ارسال کرد.

۵. نتیجه‌گیری

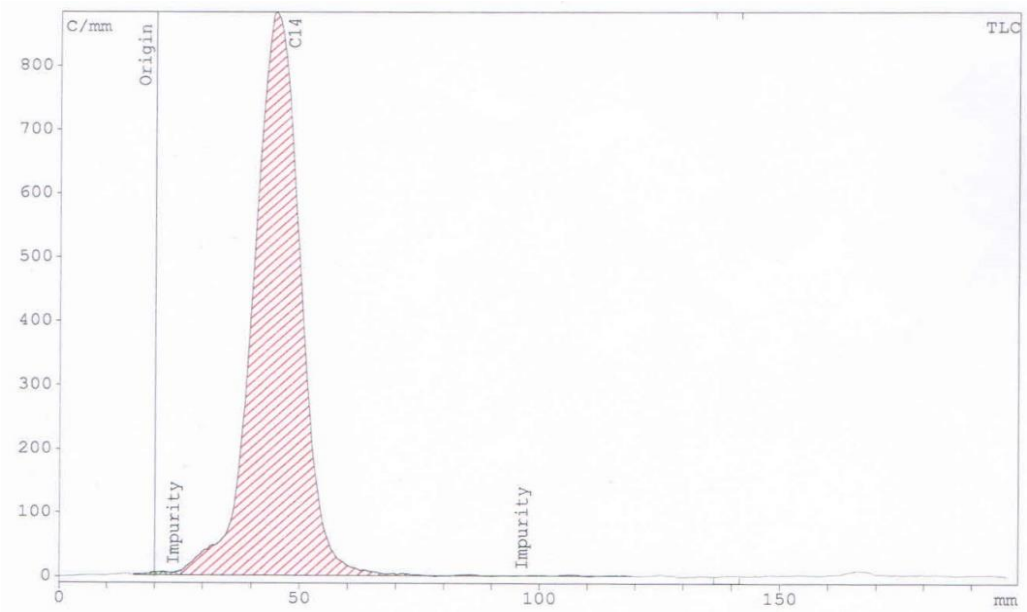
قبل از استفاده از کپسول‌های ژلاتینی پر شده می‌بایست مقدار حجم مناسبی از محلول را که می‌توان به هریک از این کپسول‌ها اضافه کرد به‌گونه‌ای که این حجم از محلول باعث ایجاد تغییر شکل در کپسول‌ها نشود، بدست آورد. برای این



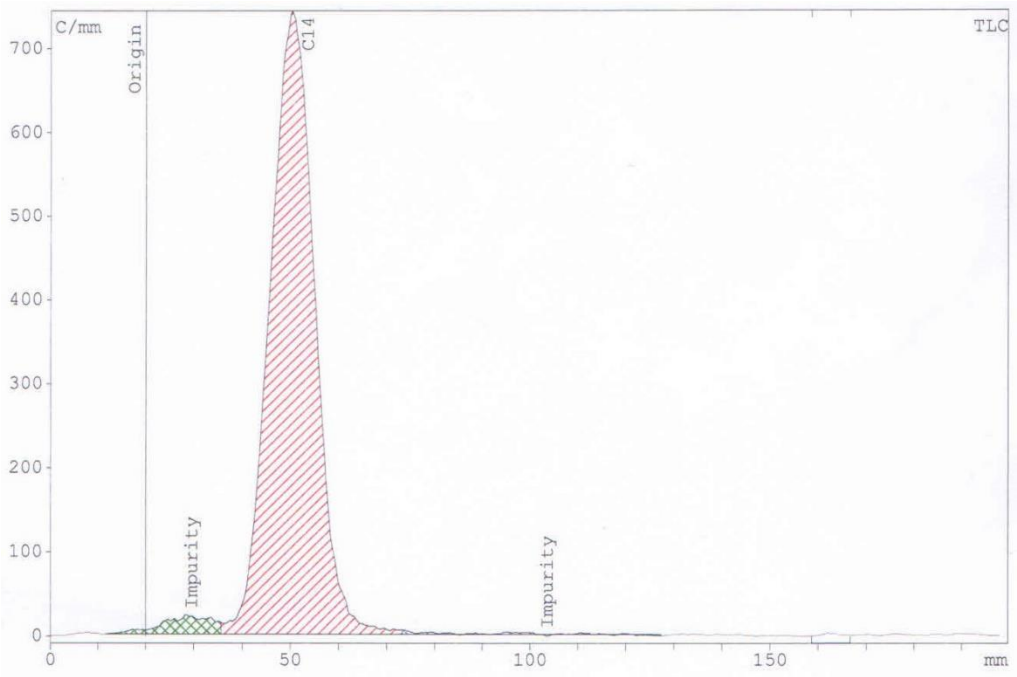
شکل۱. بررسی مدت زمان پایداری کپسول‌های آماده شده در حجم‌های مختلف برای مدت یک ماه.

1- Thin-Layer Chromatography
2- n-Butanol

منظور تعدادی کپسول ژلاتینی پر شده با مخلوطی از شوگر اسفیر و فلورسین سدیم آماده گردید. مقدار ۵ سی‌سی محلول اسید سیتریک ۰٫۰۵ مولار به‌صورت غیراکتیو تهیه شد. حجم‌های مختلفی از این محلول به‌وسیله تقسیم کننده دستی به کپسول‌های آماده شده اضافه شد. پس‌ازآن شکل ظاهری کپسول‌ها در روزهای مختلف بررسی شد و نتایج آن ثبت گردید. این آزمایش برای سه روز متوالی انجام شد و کپسول‌های آماده شده برای مدت یک ماه بررسی شدند. نتایج



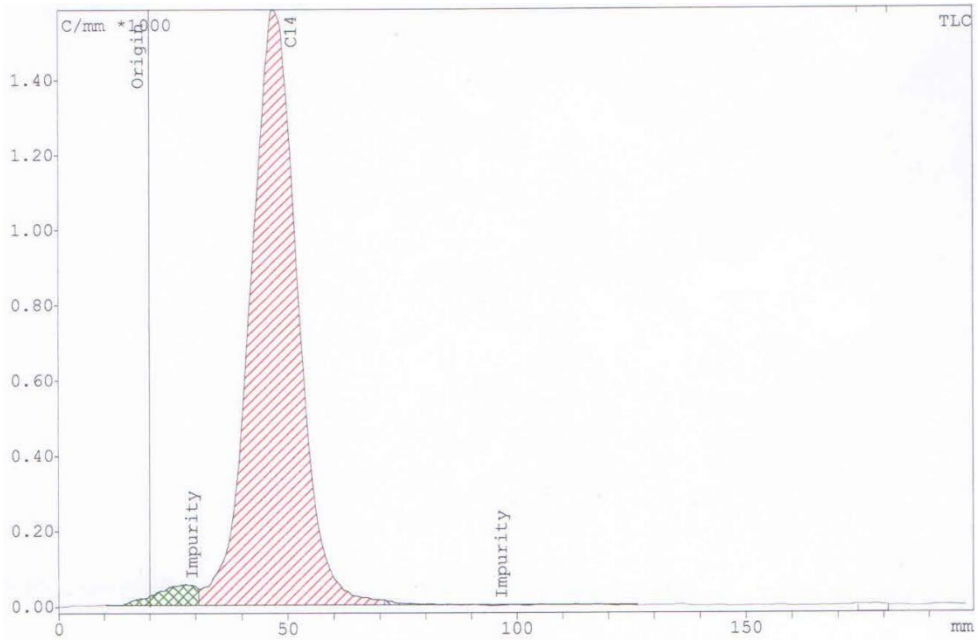
شکل۲. بررسی خلوص رادیوشیمیایی نمونه محلول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴در روز اول.



شکل۳. بررسی خلوص رادیوشیمیایی نمونه محلول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴در روز دوم.

مربوط به این آزمایش در شکل ۱ آورده شده است.

طبق نتایج بدست آمده در طی مدت یک ماه بررسی کپسول‌های ژلاتینی، حجم ۱۰ میکرولیتر مناسب‌ترین حجم جهت افزودن به کپسول‌ها در نظر گرفته شد. بررسی روزانه کپسول‌های ژلاتینی پر شده با حجم ۱۰ میکرولیتر همچنان ادامه دارد. پس از تعیین حجم و آماده‌سازی محلول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴با غلظت مناسب، تعداد سه نمونه از



شکل۴. بررسی خلوص رادیوشیمیایی نمونه محلول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴در روز سوم.

این محلول رادیواکتیو طی سه روز متوالی جهت بررسی خلوص رادیوشیمیایی آن به واحد کنترل کیفیت ارائه شد. نتایج بدست آمده از این آزمایش در شکل‌های ۲، ۳ و ۴ آورده شده است.

طبق نتایج بدست آمده و محاسبات صورت گرفته، درصد خلوص رادیوشیمیایی نمونه‌های شکل‌های ۲، ۳ و ۴ به ترتیب ۹۹/۴، ۹۷/۲ و ۹۶/۲ درصد بوده است. تمامی شمارش‌های صورت گرفته توسط آشکارساز گازی Elysia-raytest RITA انجام شده است. براساس استاندارد USP حداقل خلوص رادیوشیمیایی می‌بایست ۹۰ درصد باشد که تمامی اعداد گزارش شده بیش از این مقدار هستند، بنابراین می‌توان از محلول رادیواکتیو اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴جهت تولید کپسول استفاده کرد.

شرکت بزرگ پارس ایزوتوپ به‌عنوان تنها تولیدکننده رادیودارو در کشور، برای اولین بار در ایران موفق به تولید کپسول اوره نشاندارسازی شده با کربن-۱۴جهت تشخیص بیماری هلیکوباکتر پیلوری شده است. با تولید این رادیوداروی ارزشمند در کشور مشکلات مربوط به تشخیص این نوع بیماری برطرف شده و گام مؤثری در راستای ارتقای سطح سلامت جامعه و بهبود کیفیت زندگی بیماران که همواره یکی از اهداف مهم شرکت پارس ایزوتوپ بوده، برداشته شده است.

۶. مراجع

[1] D. O. Faigel, M. Childs, E. E. Furth, A. Alavi and D. C. Metz, "New noninvasive tests for Helicobacter pylori gastritis. Comparison with tissue-based gold standard," *Sci.*, vol. 41, pp. 740-748, 1996.

[2] L. E. Wroblewski, R. M. Peek Jr and K. T. Wilson, "Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk," *American Society for Microbiology*, 2010.

[3] G. Bell, J. Weil and G. Harrison, "14C-urea breath analysis, a non-invasive test for Campylobacter pylori in the stomach," *Lancet*, 1987.

[4] A. K. Hamlet, "14C Comments on evaluation of decay data," *LNHB*, 15 08 2011.

[5] A. Rehnberg, C. Bengtsson, R. Befrits, M. Granstro¨m and P. Hellstro¨m, "Refinement of the 14C-urea breath test for detection of Helicobacter pylori," *Scand J Gastroenterol* , vol. 36, pp. 822-826, 2001.