

بررسی سطح ادراری قند ال - فوکوز در بیماران مبتلا به سرطانهای دستگاه گوارش و ژنیکولوژیک

دکتر محمد انصاری - استادیار بخش بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر ابراهیم جوادی - استادیار بخش بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر محسن وثوقی - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر وحید نیک اقبال - دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Assessment of Urinary L-Fucose Level in Gastrointestinal and Gynecological Neoplasms ABSTRACT

L-fucose (6-deoxy. L. galactose) is the only monosaccharide which is placed in non reducing position of glycoproteins structure in L-deoxy form.

L- fucosidase and fucosyl 1 transferase directly take part in the elevation or decrease of serum L-fucose levels.

Tumors may directly induce enzymes that release L-fucose from glycoproteins formed in the neoplastic tissue, or the glycoproteins may be released indirectly as a result of body-defense metabolic secretion of glycoproteins and their filtration in glomerulus, and has a close correlation with glomerular filtration rate (GFR).

In this study we compared urinary L-fucose of 30 known cases of cancer versus 40 healthy people. Fifteen patients had Gastrointestinal (GI) cancer and 15 patients Gynecologic (Gyn) cancer.

There was significant difference between urinary L-fucose of patients with GI cancer and controls ($P < 0.01$), and also we saw the same result ($P < 0.01$) in Gyn patients in comparison with controls.

Significant elevations of urinary L-fucose, in GI and GY cancers may lead us in the way to further evaluation of its relationship with L-fucose levels to make its early diagnosis and better prognosis in susceptible individuals and those at a high risk of developing cancer, possible.

خلاصه

ال - فوکوز (۶ - داکسی ال - گالاکتوز) تنها قندی است که به حال ال - داکسی در ساختمان گلیکوپروتئینها و در موقعیت غیر احیاء انتهائی در این ترکیبات قرار دارد.

آنزیمهای الفا - ال فوکوزیداز و فوکوزیل ترانسفراز در افزایش یا کاهش سطح سرمی این قند مستقیماً دخالت دارند. تومورها ممکن است در اثر رهاسازی گلیکوپروتئینهای ناشی از رشد بی رویه یافت، موجب القاء آنزیم رها کننده ال - فوکوز گردند، یا در اثر

مکانیسمهای دفاعی، قسمتی از گلیکوپروتئینها را آزاد و سپس فوکوز حاوی خود را رها کنند.

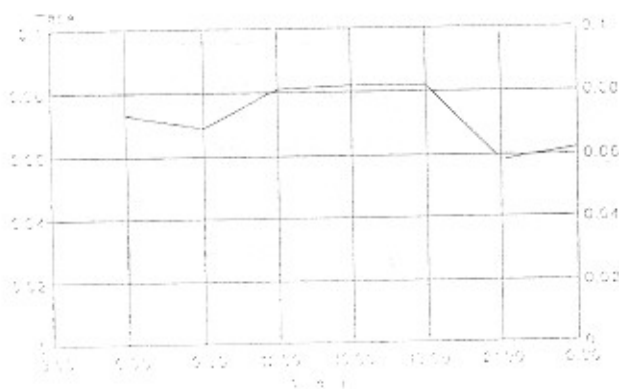
غلظت ال - فوکوز در ادرار نشانگر ترشح متابولیکی گلیکوپروتئینها و فیلتره شدن فوکوز آنها در ادرار است. در این بررسی سطح ادراری ال فوکوز ۳۰ بیمار سرطانی بستری در بیمارستان امام خمینی تهران که تحت نظر پزشکان متخصص مربوطه بوده‌اند، و ۴۰ نفر اشخاص سالم به عنوان شاهد مقایسه

روش و مواد

در این بررسی سطح ادراری ال - فوکوز ۳۰ بیمار سرطانی و ۴۰ نفر اشخاص سالم به عنوان شاهد مقایسه شده است. بیماران سرطانی شامل ۱۵ بیمار سرطانی دستگاه گوارش و ۱۵ بیمار سرطان ژنیکولوژیک بوده‌اند.

بیماران از بخشهای داخلی زنان بیمارستان امام خمینی با تشخیص قطعی پزشکان متخصص انتخاب گردیدند که عمل جراحی نشده و هنوز تحت درمانهای رادیوتراپی و شیمی درمانی قرار نگرفته بودند و از لحاظ Stage، اغلب بیماران Stage 1 بودند و چند نفری Stage 2 بودند که سطح ال - فوکوز در هر دو نزدیک بهم بودند. نمونه‌های تهیه شده شامل ادرار بیماران و افراد نرمال بوده است که جهت تعیین میزان کراتینین، ادرار ۲۴ ساعته جمع‌آوری و در روز بعد تعیین مقدار می‌گردید. فعالیت کلیوی در کلیه بیماران و کنترل‌ها بررسی و میزان کراتینین افراد نرمال مورد مطالعه در حدود طبیعی بوده است: در مردان 295 ± 1460 mg/24h و در زنان 320 ± 1218 mg/24h. علی‌رغم اینکه بیماران مورد مطالعه از هیچ بیماری کلیوی شکایت نداشتند و معاینات پزشکی نیز گواهی این مسئله می‌باشد، نظر به اینکه رابطه نزدیکی بین میزان ال - فوکوز ادراری و سطح کراتینین ادرار دیده می‌شود (۴) سطح کراتینین بیماران اندکی بالاتر بوده است: در مردان 480 ± 1608 mg/24h و در زنان 407 ± 1561 mg/24h. با توجه به نمودار شماره (۱) از ۵ فرد نرمال در ساعتهای مختلف نمونه ادرار تهیه گردید. بالاترین سطح ادراری ال - فوکوز بین ساعات ۱۲ - ۱۸ بدست آمد. بدیهی است همه تغییرات در این افراد در محدوده نرمال بوده است. لذا نمونه‌گیری از افراد نرمال و سرطانی در محدوده ساعات ۱۲ - ۱۸ انجام پذیرفت تا در ساعتهای پیک، میزان ال - فوکوز در بیماران و افراد نرمال با هم مقایسه گردد.

نمودار ۱- میزان ال - فوکوز در ساعتهای مختلف



این تغییر قابل ملاحظه در بیماران یاد شده در بررسی‌های وسیع‌تر شاید ما را به جهت شنایائی زودرس اشخاص مستعد به سرطان رهنمون سازد که از این رهگذر بتوان در درمان به موقع و قبل از متاستاز اقدام مؤثر به عمل آورد.

مقدمه

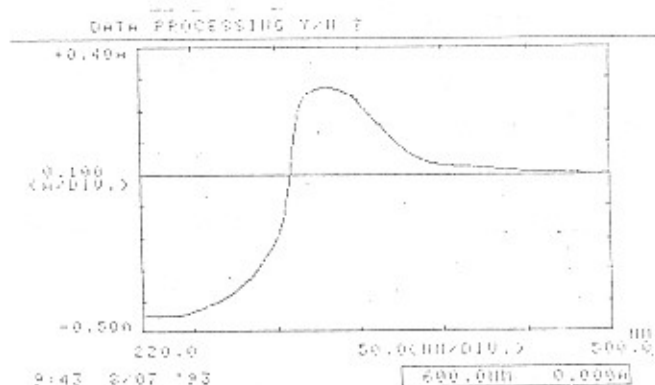
جزء هیدروکربوری گلیکوپروتئینها به صورت کووالانسی به جزء پپتیدی آن متصل شده است (۱). کریویدراتهایی که اغلب در ساختمان گلیکوپروتئینها شرکت دارند عبارتند از ال - فوکوز یا (۶- داکسی ال - گالاکتوز)، د - مانوز، د - گالاکتوز، د - گلوکز آمین، د - گالاکتوز آمین و د - نورامینیک اسید، که با پیوند کووالان به پروتئین مربوطه متصلند (۱۲). همانطور که ملاحظه می‌شود در میان این قندها فقط فوکوز به صورت ایزومر (ال) در ساختمان گلیکوپروتئینها حضور دارد (۱۳).

سطح گلیکوپروتئینها در محدوده وسیعی از حالت‌های پاتولوژیک افزایش می‌یابد و بالا بودن سطح سرمی گلیکوپروتئینها در بیماریهای بدخیم در بسیاری از گزارش‌ها قید شده است (۱). اندازه‌گیری سطح سرمی برخی کریویدراتهای گلیکوپروتئینی به عنوان شاخص برای تعیین سطح گلیکوپروتئینها مورد استفاده قرار می‌گیرد. یکی از این مونوساکاریدها ال - فوکوز است (۱). ال فوکوز در میان مونوساکاریدهای پستانداران بی‌نظیر است زیرا تنها قندی است که به صورت داکسی در گلیکوکوئز و گاه‌ها یافت می‌شود و تنها قندی است که به فرم (ال) در این ساختمانها دیده می‌شود.

این مونوساکارید در ساختمان هیدروکربوری گلیکوپروتئینها در موقعیت غیراحیاء و در انتهای آزاد زنجیره هیدروکربوری یا به صورت شاخه آزاد با کربن آنومری خود با سایر قندها پیوند گردیده است (۲).

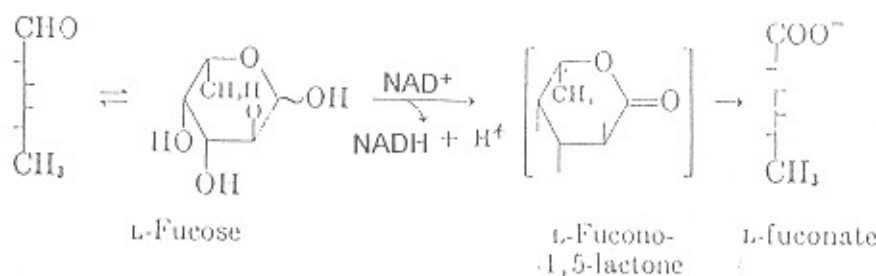
پیوند ال - فوکوز موجود در گلیکوپروتئینها تحت تأثیر آنزیم الفا ال - فوکوزیداز هیدرولیز شده و ال - فوکوز آن آزاد می‌گردد. تزریق ال - فوکوز به موشهای گرسنه سبب افزایش سطح گلیکوژن کبد نمی‌گردد، که نشان دهنده این واقعیت است که ورود ال - فوکوز به راه گلیکوژن نسبتاً کم است، و می‌توان گفت اغلب فوکوز به صورت دست نخورده از ادرار دفع می‌گردد و اندکی از آن جهت اتصال به ماکروملکولها به مصرف می‌رسد. بنابراین تغییرات سطح ادراری فوکوز در بیماریهای بدخیم می‌تواند زمینه مطالعه علائمی جهت تشخیص و احیاناً پیشگیری آن بیماریها باشد.

نمودار ۲- طیف جذبی NADH تولیدی

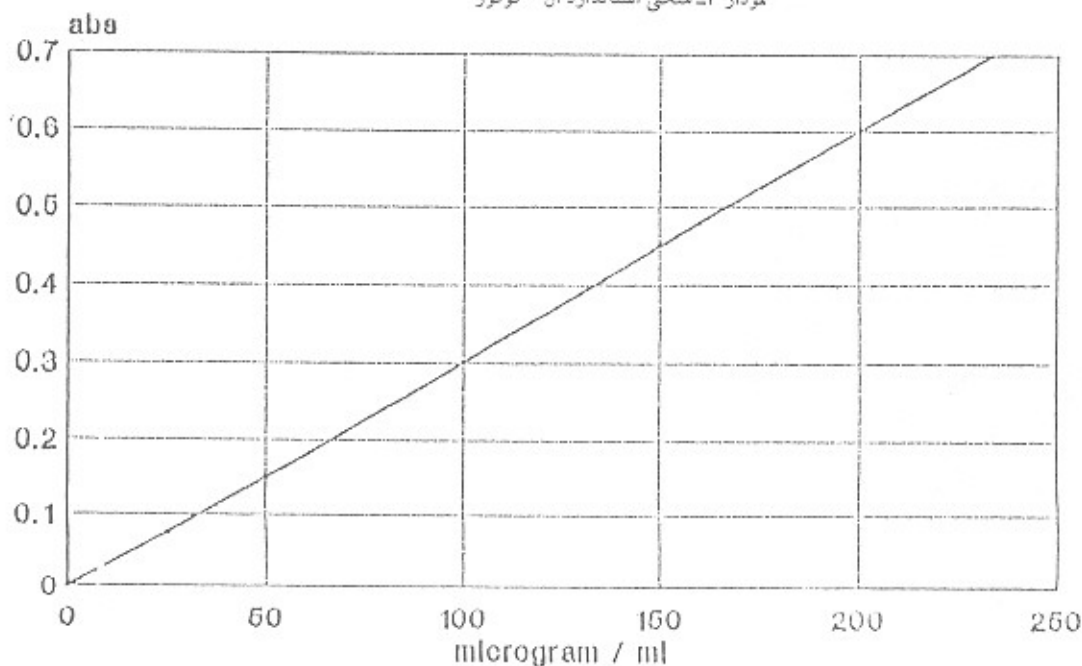


۱۰ میلی لیتر از هر نمونه ادرار در لوله حاوی تولوئن (به عنوان نگهدارنده) به آزمایشگاه منتقل و در فاصله ۲۴ ساعت که در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می شد مورد آزمایش قرار می گرفت. قبلاً رسوب و مواد نامحلول نمونه ها با سانتریفوژ جدا می گردید. ال - فوکوز به روشهای مختلف قابل اندازه گیری است که ما در این بررسی از روش ماساهیکو ایتدو و همکاران (۱۹۸۰) که یک روش اسپکتروفتومتری است (۱۷ و ۴) استفاده کردیم. اساس این روش عبارت است از ماکزیمم جذب نوری توسط NADH تولید شده، که از واکنش بین ال - فوکوز و آنزیم ال - فوکوز دهیدروژناز و NAD⁺ حاصل می شود. یعنی در اثر این واکنش ال - فوکوز به ال فوکونولاکتون و نیز NADH به NAD⁺ تبدیل می گردد، که مقدار NADH تولید شده معادل مقدار ال - فوکوز موجود در نمونه است. طیف جذبی NADH در محدوده ۲۲۰ تا ۵۰۰ نانومتر می باشد که حداکثر جذب آن در ۳۴۰ نانومتر میباشد (نمودار ۲). با یک روش اسپکتروفتومتری مقدار ال - فوکوز موجود در نمونه ادرار را در PH = 9.5 در حضور کوآنزیم NAD⁺ (Sigma Chemical Co. و آنزیم ال - فوکوز دهیدروژناز (E.C.1.1.1.122) (Sigma Chemical Co.) در مقابل پلانک که فاقد آنزیم ال - فوکوز دهیدروژناز می باشد، در ۳۴۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر UV مدل

شیمادزو سنجش نمودیم و از روی نمودار استاندارد مقدار ال - فوکوز در هر نمونه را مشخص نمودیم. توضیح اینکه PH مورد نظر با استفاده از بافر گلیسین (Merck) تنظیم گردید، و برای رسم منحنی استاندارد و با استفاده از غلظت های مختلف و مشخص ال - فوکوز (Sigma Chemical Co.) در حضور کوآنزیم و آنزیم یاد شده جذب های مختلفی بدست آمده که در نمودار (۳) ملاحظه می گردد. بدیهی است که این روش اسپکتروفتومتری برای سنجش ال - فوکوز بسیار ساده و در هر آزمایشگاهی، طی کمتر از دو ساعت قابل اجرا است.



نمودار ۳- منحنی استاندارد ال - فوکوز

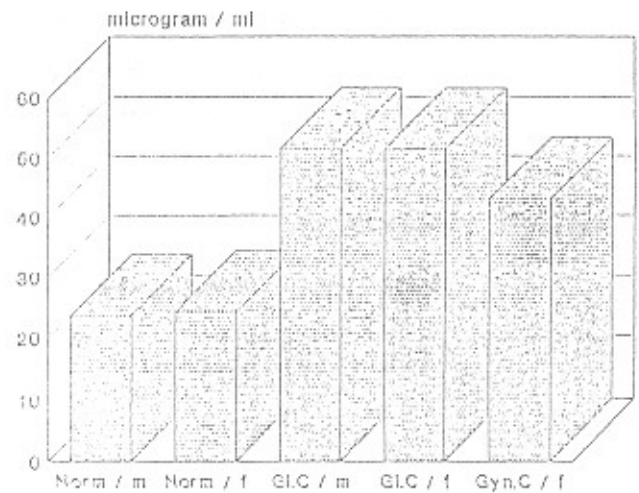


نتایج

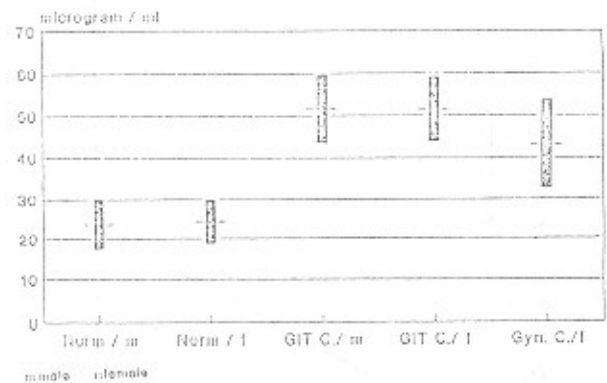
نتایج حاصل از اندازه گیری سطح ادراری ال - فوکوز در گروه های کنترل و بیمار به شرح زیر می باشد:

۱ - افراد نرمال مورد بررسی شامل ۱۲ نفر زن و ۲۸ نفر مرد بودند میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) ال - فوکوز در افراد کنترل $23/75 \pm 5/93$ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. در این بررسی رابطه مقدار ال - فوکوز ادرار و سن و جنس نیز مورد بررسی قرار گرفت که میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) ال - فوکوز در مردان نرمال برابر $23/55 \pm 6/2$ میکروگرم در میلی لیتر و در زنان نرمال برابر $24/2 \pm 5/5$ میکروگرم در میلی لیتر بوده است. (نمودار ۴ و ۵).

نمودار ۴- مقایسه کلی بین افراد نرمال با بیماران سرطانی (زن و مرد)



نمودار ۵) مقایسه سطح ادراری ال - فوکوز در افراد نرمال با بیماران سرطانی یا احتساب واریانس (زن و مرد)



محدوده سنی افراد نرمال بین ۲۰ - ۶۰ سال بوده که جدول شماره (۱) و نمودار شماره (۶) بیانگر میانگین و انحراف معیار (mean ± SD) سطح ادراری ال - فوکوز در گروه های سنی مختلف می باشد. این مقایسه نشان می دهد که اختلاف معنی داری

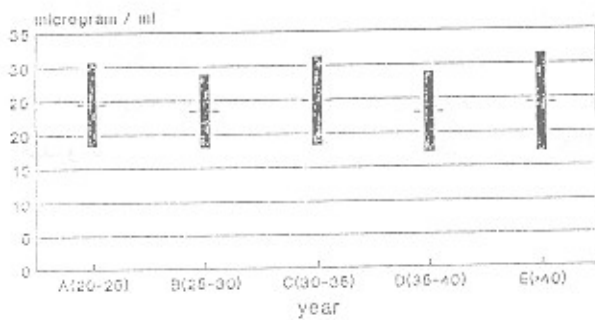
در میزان ال - فوکوز وابسته به جنس نبوده و اختلاف معنی داری بین دو جنس مشاهده نگردید.

جدول (۱) میانگین

سطح ادراری ال فوکوز در گروه های سنی مختلف

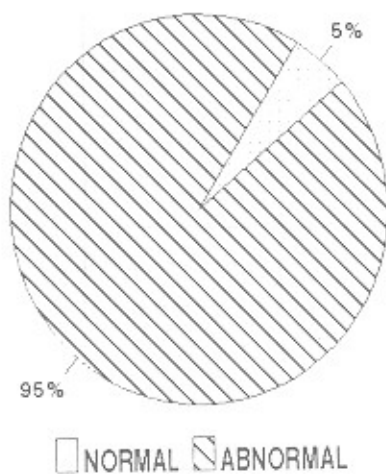
تعداد نفر	ال فوکوز (mean ± SD) میکروگرم در میلی لیتر	گروه سنی سال
۱۳	$24/5 \pm 6/2$	۲۰ - ۲۵
۷	$23/4 \pm 5/4$	۲۵ - ۳۰
۹	$24/8 \pm 6/5$	۳۰ - ۳۵
۵	$23/0 \pm 5/9$	۳۵ - ۴۰
۴	$24/3 \pm 7/2$	> ۴۰

نمودار ۶- رابطه سطح ادراری ال - فوکوز و سن



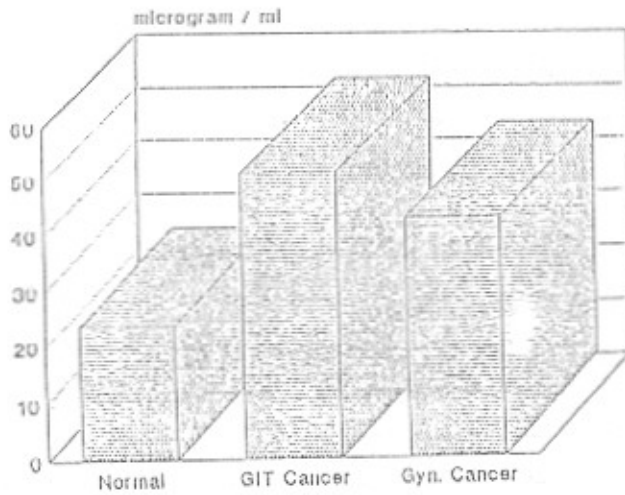
از بین ۴۰ نفر افراد کنترل نرمال ۲ نفر دارای سطح ادراری ال - فوکوز بیش از (mean ± 2SD) بودند. دو نفر $27/45 \pm 2/6$ میکروگرم در میلی لیتر بوده که در محدوده سطح ادراری افراد سرطانی می باشد در حالیکه (mean ± 2SD) در افراد سالم $35/61$ میکروگرم در میلی لیتر می باشد.

نمودار ۷- درصد افراد مثبت کاذب

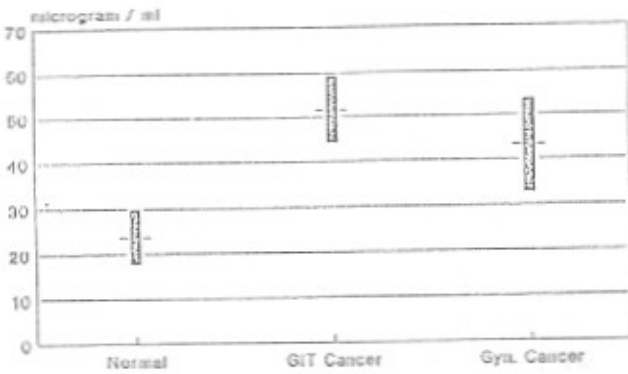


۲ - بیماران مبتلا به سرطان در این بررسی شامل در گروه می باشد:

نمودار ۹- مقایسه سطح ادراری ال - فوکوز در افراد نرمال با افراد سرطانی



نمودار ۱۰- مقایسه سطح ادراری ال - فوکوز در افراد نرمال با افراد سرطانی با احتساب واریانس



با توجه به جدول شماره ۲ که مقایسه گروه‌های بیمار را با افراد نرمال نشان می‌دهد، ملاحظه می‌گردد:

۱- میانگین سطح ادراری ال - فوکوز در سرطانی‌های گوارشی با افراد کنترل بطور معنی‌داری اختلاف دارند ($P < 0.01$) (نمودار شماره ۴).

۲- در مقایسه بین میانگین سطح ادراری بیماران سرطانی زئیکولوژیک و افراد نرمال نیز اختلاف معنی‌داری ملاحظه می‌شود ($P < 0.01$) (نمودار شماره ۴).

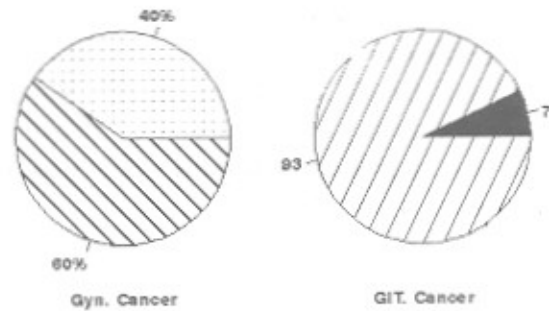
جدول ۲- مقایسه گروه‌های بیمار و افراد نرمال

Group	df	t	t 0.995	Result
1	53	14.4	2.66	$X_1 \neq X_2 (P < 0.01)$
2	53	8.3	2.66	$X_1 \neq X_2 (P < 0.01)$

گروه سرطانی دستگاه گوارش شامل سرطانی‌های آدنوکارسینوم معده، کارسینوم کولون، کانسر مری و کارسینوم سنگفرشی کاردیای معده و گروه سرطانی‌های زئیکولوژیک شامل کانسر رحم، کانسر تخمدان و کانسر دهانه رحم.

الف - میانگین و انحراف معیار ($\text{mean} \pm \text{SD}$) سطح ادراری ال - فوکوز در نمونه‌های مبتلا به سرطانی دستگاه گوارش برابر $51/57 \pm 7/5$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. از کل بیماران این گروه که ۱۵ نفر بودند، سطح ال - فوکوز در ۱۴ نفر بالای $35/61$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود که بیش از $(\text{mean} \pm 2\text{SD})$ افراد کنترل بوده است. فقط در یک نفر سطح ادراری ال - فوکوز کمتر از حد $(\text{mean} \pm 2\text{SD})$ بوده است. با توجه به این، در تمام افراد سطح ال - فوکوز بیش از $(\text{mean} \pm \text{SD})$ بوده است. نمودار شماره ۸) نشان می‌دهد که فقط ۷٪ مبتلایان به سرطانی گوارش دارای سطح ادراری ال - فوکوز در محدوده نرمال می‌باشند، و مابقی دارای سطح ادراری ال - فوکوز بیش از افراد نرمال بودند.

نمودار ۸- درصد افراد منق کاذب



ب - میانگین سطح ادراری ال - فوکوز در سرطانی‌های زئیکولوژیک که جمعاً ۱۵ نفر بودند $(\text{mean} \pm \text{SD}) 10/4 \pm 43/0$ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است که از این تعداد ۹ نفر سطحی بیش از $(\text{mean} + 2\text{SD})$ افراد کنترل و ۶ نفر دیگر سطحی کمتر از $(\text{mean} - 2\text{SD})$ افراد کنترل را نشان می‌دادند. لکن در تمام افراد این گروه نیز سطح ادراری ال - فوکوز بیش از $(\text{mean} + \text{SD})$ افراد کنترل بوده است (نمودار ۸).

بحث

مقایسه سطح ادراری ال - فوکوز در افراد کنترل و مجموع بیماران سرطانی اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.

برخوردار است، می توان نتیجه گرفت که ممکن است تومورها در اثر رهاسازی گلیکوپروتئین های حاوی ال - فوکوز موجب القاء آنزیم رها کننده ال - فوکوز گردند، یا در اثر مکانیسم های دفاعی بدن، قسمتی از گلیکوپروتئین ها آزاد و سپس فوکوز حاوی آنها آزاد گردد (۱۰ و ۱۱).

معنی دار بودن غلظت ادراری ال - فوکوز در بیماران سرطانی، ما را در جهت بررسی های وسیع تر جهت تشخیص زودرس در اشخاص مستعد به سرطان رهنمون می سازد و شاید بتوان بدین ترتیب از ایجاد متاستاز در بافت های مجاور جلوگیری و نسبت به نجات بیمار اقدام به موقع به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

در تدوین این مقاله خانمها زرین توکلی و اعظم سلامی با ما همکاری صمیمانه ای داشته اند که بدین وسیله از نامبردگان تشکر می نمائیم.

منابع

1. Barlow. J.J et al: Serum Protein - bound fucose in patients with gynecologic cancers. *Obst & Gyneco* 39(5): 727, (1972).
2. Chan. J.Y et al: L-fucose metabolism in mammals. *J. Biol. Chem* 254 (15): 7060 (1979).
3. Chang. S. et al: An epimerase - reduclase in L-fucose synthesis. *J. Biol. Chem* 263 (4) 1693 (1988)
4. Endo. M et al: Enzymic determination of urinary free L-fucose. *clin. chim. acta* 103: 269 (1980).
5. Gaturner et al: Relation between raised concentration of fucose. *J. clin. pathol.* 38: 588 (1985).
6. Ishihara. H. et al: The metabolism of L-fucose. *J. Biol. chem* 243 (6): 1103 (1968).
7. Ishihara. H et al: The metabolism of L-fucose. *J. Biol. chem* 243 (6): 1110 (1968).
8. Mobley. P. W. et al: L-fucose dehydrogenase from sheep liver *Methods Enzymol* 41 ptb 173 (1975).
9. Morris. J. B: Enzymatic assay for subnanomole amounts of L-fucose. *Anal. Biochem* 121: 129 (1982).
10. Rosato. F. E.: Serum glycoproteins in the evaluation of breast

گرچه در شرایط نرمال، کید محل بیوسنتز بخش های کریو- هیدراتی و پروتئینی گلیکوپروتئین ها است لکن بافت های نئوپلاستیک نیز ممکن است در سنتز یا رهاسازی غیرطبیعی بخش های هیدروکربوری این ماکرومولکولها نقش عمده داشته باشد (۱).

همچنین ممکن است تومور در اثر رهاسازی گلیکوپروتئین های سلولهای تومورال تخریب شده، در افزایش میزان ال - فوکوز سرمی و در نهایت ادرار مؤثر باشد (۴).

افزایش سطح سرمی ال - فوکوز ممکن است منجر به فوکوزیلاسیون گلیکوپروتئین ها گردد که این پدیده در اثر آنزیم فوکوزیل ترانسفراز در بافت های توموری صورت می گیرد. به همین دلیل سطح بالای سرمی آنزیم فوکوزیل ترانسفراز در بیماران سرطانی گزارش گردیده است (۱۰ و ۱۳). با توجه به نتایج حاصل از این بررسی که میزان ال - فوکوز در بیماران سرطان دستگاه های گوارشی و ژنیپکولوژیک از افزایش قابل ملاحظه و معنی داری

cancer surg. *Gyneco & Obst* 124: 1291 (1968).

11. Rosato. F. E: Glycoproteins in mamary cancer. *Ann. Surg.* 168 (5): 818 (1968).
12. Rosato. F.E. et al: Serum Protein bound fucose and carcinoma of the female breast. *Am. J. surg* 118: 61 (1969).
13. Rosato. F. E. et al: serum fucose in the diagnosis of breast cancer. *Cancer* 28 (6): 1575 (1971)
14. Sakai. T et al: Rapid, simple enzymatic assay of free L-fucose. *Clin. Chem.* 36 (3): 474 (1990)
15. Spiro. R.G.: Glycoproteins, structure, metabolism and biology. *New. Eng. J. Med.* 269: 566 (1963).
16. Tatsumura. T. et al: Clinical significance of fucose level in glycoprotein, cancer. *Res* 37: 4101 (1977).
17. Tsay. G. C: A sensetive spectropholometric method for delection of L-fucose. *Anal. Biochem* 78: 423 (1977).
18. Warren. L: An assay for free L- fucose in the presence of the bound suyar. *Anal. Biochem* 64: 343 (1975).

۱۹- سرطانهای دستگاه گوارش در ایران، تألیف دکتر حسین هاشمی (طرفی)، انتشارات دانشگاه تهران. سال (۱۳۶۳)