

Comparing Endothelin A Receptor Expression in Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma

Mahdieh Rajabi-Moghaddam¹,

Hamid Abbaszadeh²,

Hemmat Gholinia³

¹ Pathologist, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

² Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

³ MSc in Statistics, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received January 6, 2017 ; Accepted March 7, 2018)

Abstract

Background and purpose: Endothelin axis (endothelin or ET) including endothelin A receptor (ET_A) play a major role as the regulator of vessels tone and tissue differentiation and development. There are evidences of the importance of endothelin axis in carcinogenesis. No data exists about comparison of ET_A expression between dysplasia and oral squamous cell carcinoma (OSCC). So, the aim of this study was to compare immunohistochemical expression of ET_A between these two groups.

Materials and methods: In this cross-sectional study, the paraffin-embedded tissue blocks of 20 cases of dysplastic oral mucosa and 21 cases of OSCCs were investigated. Three micron sections were prepared from tissue blocks and stained with ET_A antibody using immunohistochemistry. Percentage of stained cells and staining intensity were compared between the groups applying Mann-Whitney and Chi-Square tests.

Results: In dysplasia group, 11 cases stained for ET_A while in OSCC group all cases stained. Comparison of percentage of stained cells and their semi quantitative classification showed significant differences between the two groups ($P=0.02$ and $P=0.005$, respectively) such that ET_A expression was higher in OSCC than dysplasia. Staining intensity for ET_A was significantly higher in OSCC group ($P=0.006$). There were significant differences between ET_A expression in mild and moderate dysplasia with carcinoma.

Conclusion: Our results support the role of ET_A receptor in progression of dysplasia toward OSCC.

Keywords: squamous cell carcinoma, dysplasia, endothelin A receptor

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (165): 47-56 (Persian).

* **Corresponding Author: Hamid Abbaszadeh** - Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran (E-mail: hamidabbaszade@yahoo.com)

مقایسه ی بیان گیرنده اندوتلین A در دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

مهدیه رجبی مقدم^۱

حمید عباس زاده^۲

همت قلی نیا^۳

چکیده

سابقه و هدف: محور اندوتلین (Endothelin یا ET) شامل گیرنده اندوتلین A (ETA)، نقش مهمی به عنوان تنظیم کننده تونوسیت عروق و تمایز بافتی ایفا می نماید. شواهدی از اهمیت محور اندوتلین در کارسینوز وجود دارد. هیچ گونه اطلاعاتی در رابطه با مقایسه بیان ETA بین دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان موجود نیست. بنابراین هدف از مطالعه حاضر مقایسه بیان ایمونوهیستوشیمیایی ETA بین این دو گروه بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی، جامعه مورد مطالعه شامل بلوک های بافتی پارافینه ۲۰ مورد دیسپلازی و ۲۱ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود. مقاطع سه میکرونی از بلوک ها تهیه و به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی ETA رنگ آمیزی شدند. درصد سلول های رنگ گرفته و شدت رنگ پذیری سلول ها بین دو گروه با استفاده از آزمون های آماری من ویتنی و کای اسکوار در سطح معنی داری $p < 0.05$ مقایسه شد.

یافته ها: در گروه دیسپلازی، ۱۱ نمونه برای ETA رنگ گرفتند و در گروه کارسینوم تمامی نمونه ها رنگ رفتند. مقایسه درصد سلول های رنگ گرفته و طبقه بندی نیمه کمی آن تفاوت معنی داری را بین دو گروه نشان داد (به ترتیب $p = 0.02$ و $p = 0.05$)، به گونه ای که بیان ETA در کارسینوم بیش تر از دیسپلازی بود. شدت رنگ پذیری ETA در گروه کارسینوم به طور معنی داری بیش تر از دیسپلازی بود ($p = 0.06$). تفاوت معنی داری بین بیان ETA در دیسپلازی خفیف و متوسط با کارسینوم وجود داشت.

استنتاج: یافته های ما حاکی از نقش گیرنده ETA در پیشرفت دیسپلازی به سمت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان است.

واژه های کلیدی: کارسینوم سلول سنگفرشی، دیسپلازی، گیرنده اندوتلین A

مقدمه

تا ۲۰ درصد ضایعات دیسپلاستیک به سمت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان پیشرفت می کنند. تغییرات بدخیم مخاط دهان احتمالاً توسط موتاسیون ژن های دخیل در تنظیم رشد سلولی ایجاد می شود که منجر به عدم تنظیم

دیسپلازی دهان یک وضعیت پیش بدخیم نسبتاً شایع و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (Oral squamous cell carcinoma یا OSCC)، شایع ترین بدخیمی حفره دهان است (۱). در حفره دهان، ۱۰

E-mail: hamidabbaszade@yahoo.com

مؤلف مسئول: حمید عباس زاده- بیرجند: دانشکده دندانپزشکی بیرجند

۱. پاتولوژیست، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۲. استادیار، گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

۳. کارشناس ارشد آمار، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱۲/۱۶

پروتئینی و در نتیجه افزایش پرولیفراسیون سلولی، کراتینیزاسیون غیر طبیعی، دیسپلازی اپی تلیالی، افزایش قدرت حرکت سلولی، آنژیوژنز و در نهایت تهاجم بافتی و متاستاز می‌شود (۲،۱). محور اندوتلین (Endothelin) یا ET شامل سه ایزوform ET-1، ET-2، ET-3 و گیرنده‌های ET، یعنی گیرنده اندوتلین A (ET_A) و گیرنده اندوتلین B (ET_B)، نقش فیزیولوژیک مهمی به عنوان تنظیم کننده تونوسیت عروق، تکامل و تمایز بافتی، پرولیفراسیون سلولی و تولید هورمون ایفا می‌نماید (۴،۳). تحقیقات اخیر شواهدی از اهمیت محور اندوتلین در کانسرها فراهم کرده‌اند (۶-۴). مطالعات حاضر بیانگر بروز بالای ET_A و ET_B در کانسره‌های ریه، کولون و پوست می‌باشند (۳). محور اندوتلین، رشد و پیشرفت طیفی از تومورها همچون کارسینوماهای پروستات، تخمدان، کلیه، ریه، سرویکس، پستان، ریه، مثانه، اندومتر، سارکوم کاپوزی، تومورهای مغز و ملانوم را نیز تحریک می‌نماید (۲). اجزاء سیستم اندوتلین می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم به رشد و پیشرفت تومورها کمک کنند (۲). به نظر می‌رسد که اثرات مستقیم اجزاء سیستم اندوتلین در سلول‌های نئوپلاستیک عمدتاً به واسطه اثر بر پرولیفراسیون، مهاجرت، تهاجم و مقاومت به آپوپتوز است، در حالی که مکانیسم اثرات غیرمستقیم احتمالاً مرتبط با توانایی آن در تنظیم کینازهای مختلف دخیل در پرولیفراسیون سلولی، بقاء، آنژیوژنیز، تغییر اپی تلیال به مزانشیمال، تهاجم و تحرک سلولی می‌باشد. از دیگر اثرات غیر مستقیم در کانسرها می‌توان به رسوب و ریمودلینگ ماتریکس خارج سلولی اشاره نمود. به نظر می‌رسد که اجزاء سیستم اندوتلین بتوانند از طریق القاء فاکتورهای آنژیوژنیک همچون فاکتور رشد اندوتلیال عروق و در نتیجه تحریک آنژیوژنز، به صورت غیر مستقیم به متاستاز تومور کمک نماید (۲). حضور آنتاگونیست‌های گیرنده ET_A، به عنوان یک فرصت درمانی جدید در کانسرها مطرح است (۴). بر اساس مطالعات موجود، هیچ گونه

اطلاعاتی در رابطه با مقایسه بیان پروتئین گیرنده اندوتلین A بین دیسپلازی دهان و OSCC و نقش این گیرنده در پیشرفت از دیسپلازی به سمت کارسینوم دهانی موجود نیست. بنابراین هدف از مطالعه حاضر، مقایسه بیان ایمونوهیستوشیمیایی گیرنده اندوتلین A (ET_A) بین مخاط دیسپلاستیک و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه گذشته‌نگر مقطعی، جامعه مورد مطالعه شامل ۲۰ مورد مخاط دهانی دیسپلاستیک (مشمول بر ۸ مورد دیسپلازی خفیف، ۷ مورد دیسپلازی متوسط و ۵ مورد دیسپلازی شدید) و ۲۱ مورد کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بود که از بلوک‌های پارافینه مربوط به سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۸۴ از آرشیو بخش پاتولوژی بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی بابل و بخش پاتولوژی بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران استخراج شدند. حجم نمونه بر اساس مطالعات مشابه (۸،۳،۲) تعیین گردید. دیسپلازیها، عموماً ضایعات لکوپلاکیایی در بالین بودند که پس از انجام بیوپسی و بررسی هیستوپاتولوژیک، حضور دیسپلازی در آن‌ها به تایید رسیده بود. دیسپلازی‌هایی که قبل از انجام بیوپسی، درمان دیگری دریافت کرده بودند و نیز OSCC‌هایی که درمان کموتراپی یا رادیوتراپی قبل از جراحی دریافت کرده بودند یا ضایعاتی که حاصل عود دیسپلازی یا OSCC بودند، از مطالعه خارج می‌گردیدند. بلوک‌های بافتی فاقد بافت کافی جهت مطالعه یا با فیکساسیون یا کیفیت نامناسب نیز از مطالعه خارج گردیدند. بیوپسی‌های اکسیژنال از ضایعات در مطالعه وارد گردیدند (۲). مقاطع سه میکرونی از بلوک‌ها تهیه و

به روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی بادی ET_A (NovocastraTM Liquid Mouse Monoclonal Antibody Endothelin-1 Receptor (ET_A); Leica Biosystems, Newcastle, United Kingdom, Product Code: NCL-L-ETA, Clone: RJT24, Ig Class: IgG2b)

و مثبت قوی (+3 score): رنگ پذیری سیتوپلاسمیک قوی اکثریت سلول‌ها یا رنگ پذیری قهوه‌ای سوخته (۸). در نهایت داده‌ها وارد نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۰ شدند و درصد سلول‌های رنگ گرفته و شدت رنگ پذیری سلول‌ها برای نشانگر بین دو گروه مورد مطالعه با استفاده از آزمون‌های آماری من ویتنی و کای اسکوار مورد مقایسه قرار گرفت. سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

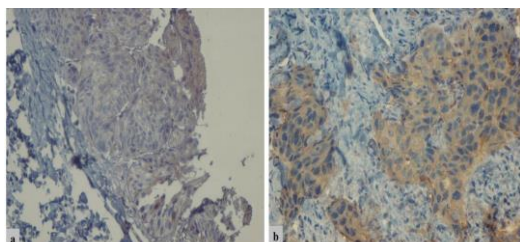
تأییدیه اخلاقی

این پژوهش به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه با کد اخلاق REC.1396.156 رسیده است.

یافته‌ها

میانگین سنی بیماران دارای ضایعات دیسپلاستیک مخاط دهان ۵۵ سال بود. ۶ نمونه (۳۰ درصد) مربوط به خانم‌ها و ۱۳ نمونه (۷۰ درصد) مربوط به آقایان بود. محل ضایعات دیسپلاستیک شامل زبان (۱۱ مورد)، لب (۳ مورد)، کف دهان (۳ مورد)، مخاط باکال (۲ مورد) و لثه (۱ مورد) بود. میانگین سنی بیماران دارای کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ۶۵ سال بود. ۷ نمونه (۳۳/۳ درصد) مربوط به خانم‌ها و ۱۴ نمونه (۶۶/۷ درصد) مربوط به آقایان بود. محل OSCC ها زبان (۱۳ مورد)، کف دهان (۴ مورد)، لثه (۲ مورد) و مخاط باکال (۲ مورد) بود.

تصویر شماره ۱، بیان گیرنده اندوتلین A در نمونه‌های دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۱: (a) رنگ پذیری با شدت متوسط گیرنده اندوتلین A در مخاط دیسپلاستیک دهان (بزرگنمایی $\times 100$)؛ (b) رنگ پذیری با شدت متوسط گیرنده اندوتلین A در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (بزرگنمایی $\times 100$)؛

رنگ آمیزی شدند. مقاطع داکتال کارسینوم breast برای کنترل مثبت استفاده شد و کنترل منفی با حذف آنتی‌بادی اولیه صورت گرفت (۲). لام‌های رنگ آمیزی شده توسط پاتولوژیست با میکروسکوپ نوری Olympus CX21 (Olympus corporation, Tokyo, Japan) با بزرگنمایی $\times 100$ و $\times 400$ مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی درصد سلول‌های رنگ شده (۷) و شدت رنگ پذیری سلول‌ها (۸) برای مارکر ETA مورد توجه بود. رنگ پذیری سیتوپلاسمیک برای نشانگر، مثبت در نظر گرفته شد (۸).

در گروه OSCC، در بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی $\times 100$ ، پنج فیلد به عنوان hot spot (فیلدهایی که در آن‌ها سلول‌های تومورال بیش‌ترین رنگ‌پذیری را داشته باشند)، انتخاب و در این فیلدها درصد سلول‌های رنگ گرفته با بزرگنمایی $\times 400$ محاسبه شدند. از پنج ناحیه انتخاب شده برای هر نمونه میانگین گرفته می‌شد و به عنوان میانگین درصد سلول‌های رنگ گرفته برای آن نمونه به ثبت می‌رسید. در مورد نمونه‌های دیسپلازی، انتخاب hot spot ها و محاسبه درصد سلول‌های رنگ گرفته در اپی‌تلیوم نمونه انجام می‌گرفت. درصد سلول‌های رنگ شده به‌طور نیمه کمی به صورت زیر طبقه‌بندی شدند:

منفی (در صورت رنگ گرفتن کم‌تر یا مساوی ۲۵ درصد سلول‌های ضایعه)، مثبت ضعیف (در صورت رنگ گرفتن ۲۶ تا ۵۰ درصد سلول‌های ضایعه)، مثبت (در صورت رنگ گرفتن ۵۱ تا ۷۵ درصد سلول‌های ضایعه) و قویاً مثبت (در صورت رنگ گرفتن بیش‌تر از ۷۵ درصد سلول‌های ضایعه) (۷). شدت رنگ پذیری سیتوپلاسمیک سلول‌های تومورال و مخاط دیسپلاستیک نیز به صورت نیمه کمی به چهار گروه طبقه‌بندی شد: منفی (score 0): عدم رنگ‌پذیری؛ مثبت ضعیف (+1 score): رنگ‌پذیری سیتوپلاسمیک ضعیف/به زحمت قابل احساس در اکثریت سلول‌ها یا رنگ‌پذیری قهوه‌ای کم‌رنگ؛ مثبت متوسط (+2 score): رنگ‌پذیری سیتوپلاسمیک متوسط در اکثریت سلول‌ها یا رنگ‌پذیری قهوه‌ای بلوطی

میانگین $\pm$ انحراف معیار درصد سلول‌های رنگ گرفته برای گیرنده اندوتلین A (ET_A) در گروه دیسپلازی و گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به ترتیب برابر با $0/43 \pm 0/4$ و $0/74 \pm 0/2$ بود. میانگین $\pm$ انحراف معیار درصد سلول‌های رنگ گرفته برای گیرنده اندوتلین A (ET_A) در سه نوع دیسپلازی خفیف، متوسط و شدید به ترتیب برابر با $0/13 \pm 0/05$ ، $0/26 \pm 0/37$ و $0/15 \pm 0/83$ بود. نتیجه آزمون من ویتنی نشان داد که بین گروه دیسپلازی و گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به لحاظ میانگین درصد سلول‌های رنگ گرفته، تفاوت آماری معناداری وجود دارد ($p \leq 0/05$) و میانگین درصد سلول رنگ گرفته در گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به‌طور معنی‌داری از گروه دیسپلازی بیش‌تر بود. نتایج همین آزمون نشان داد که بین گروه دیسپلازی خفیف و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و بین گروه دیسپلازی متوسط و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به لحاظ میانگین درصد سلول‌های رنگ گرفته، تفاوت آماری معناداری وجود دارد (در هر دو مورد $p < 0/001$) و میانگین درصد سلول رنگ گرفته در گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به‌طور معنی‌داری از گروه دیسپلازی خفیف و متوسط بیش‌تر بود، در حالی که بین گروه دیسپلازی شدید و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به لحاظ میانگین درصد سلول‌های رنگ گرفته، تفاوت آماری معناداری وجود نداشت (در هر دو مورد $p > 0/05$). تمامی نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان برای گیرنده اندوتلین A (ET_A) رنگ گرفتند و ۹ نمونه از نمونه‌های مخاط دیسپلاستیک برای این مارکر رنگ نگرفتند. نتیجه آزمون کای اسکوار نشان داد که به لحاظ طبقه‌بندی نیمه کمی، درصد سلول‌های رنگ گرفته نیز تفاوت آماری معنی‌داری بین دو گروه دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وجود دارد ($p < 0/05$) (جدول شماره ۱).

در گروه دیسپلازی خفیف به لحاظ طبقه‌بندی نیمه کمی درصد سلول‌های رنگ گرفته برای گیرنده

اندوتلین A، ۷ مورد رنگ نگرفتند و یک مورد دارای رنگ پذیری مثبت ضعیف بود. در حالی که در گروه دیسپلازی متوسط، ۲ مورد رنگ نگرفته، ۲ مورد دارای رنگ‌پذیری مثبت ضعیف و ۳ مورد دارای رنگ‌پذیری مثبت بودند و در گروه دیسپلازی شدید، یک مورد دارای رنگ‌پذیری مثبت و ۴ مورد دارای رنگ‌پذیری قویاً مثبت بودند. نتیجه آزمون کای اسکوار نشان داد که به لحاظ طبقه بندی نیمه کمی، درصد سلول‌های رنگ گرفته، تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه دیسپلازی خفیف و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و بین گروه دیسپلازی متوسط و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وجود دارد (به ترتیب $p < 0/001$ و $p = 0/01$)، به گونه‌ای که در نمونه‌های کارسینوم، درصد رنگ‌پذیری بالاتری در مقایسه با دیسپلازی خفیف و متوسط نشان دادند؛ تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه دیسپلازی شدید و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وجود نداشت ($p = 0/8$). جدول شماره ۲ طبقه‌بندی شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها برای گیرنده اندوتلین A (ET_A) را نشان می‌دهد. با توجه به نتیجه آزمون کای اسکوار، به لحاظ شدت رنگ‌پذیری نیز تفاوت آماری معنی‌داری بین مخاط دیسپلاستیک دهان و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مشاهده شد ($p < 0/05$).

جدول شماره ۱: مقایسه دسته بندی درصد سلول های رنگ گرفته برای گیرنده اندوتلین A در گروه های مورد مطالعه

گروه	درصد سلول های رنگ گرفته				سطح معنی داری
	منفی	مثبت ضعیف	مثبت	قویا مثبت	
کارسینوم سلول سنگفرشی	تعداد ۰	۴	۶	۱۱	۰/۰۰۵
درصد ۰		۱۹	۲۸/۶	۵۲/۴	
دیسپلازی	تعداد ۹	۳	۴	۴	
درصد ۴۵		۱۵	۲۰	۲۰	

جدول شماره ۲: مقایسه دسته بندی شدت رنگ پذیری سلول ها برای گیرنده اندوتلین A در گروه های مورد مطالعه

گروه	شدت رنگ پذیری				سطح معنی داری
	منفی	مثبت ضعیف	مثبت متوسط	مثبت قوی	
کارسینوم سلول سنگفرشی	تعداد ۰	۱۲	۸	۱	۰/۰۰۶
درصد ۰		۵۷/۱	۳۸/۱	۴/۸	
دیسپلازی	تعداد ۹	۷	۳	۱	
درصد ۴۵		۳۵	۱۵	۵	

نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان دارای شدت رنگ‌پذیری بیش‌تری نسبت به نمونه‌های مخاط دیسپلاستیک بودند. در گروه دیسپلازی خفیف، ۷ مورد رنگ نگرفتند و یک مورد دارای شدت رنگ‌پذیری مثبت ضعیف بود. در گروه دیسپلازی متوسط، ۲ مورد رنگ نگرفتند، ۴ مورد دارای شدت رنگ‌پذیری مثبت ضعیف و یک مورد دارای شدت رنگ‌پذیری مثبت متوسط بودند. در گروه دیسپلازی شدید، ۲ مورد دارای شدت رنگ‌پذیری مثبت ضعیف، ۲ مورد دارای شدت رنگ‌پذیری مثبت متوسط و یک مورد دارای شدت رنگ‌پذیری مثبت قوی بودند. با توجه به نتیجه آزمون کای اسکوار، به لحاظ شدت رنگ‌پذیری تفاوت آماری معنی‌داری بین دیسپلازی خفیف و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مشاهده شد ($p < 0/001$)، به گونه‌ای که نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان دارای شدت رنگ‌پذیری بیش‌تری نسبت به نمونه‌های دیسپلازی خفیف بودند. اما از این لحاظ، تفاوت آماری معنی‌داری بین دیسپلازی متوسط و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و بین دیسپلازی شدید و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مشاهده نشد (به ترتیب $p = 0/11$ و $p = 0/43$).

بحث

با توجه به نقش ETA در کارسینوژنز بدخیمی‌های سایر نواحی بدن، مطالعه حاضر با هدف مقایسه بیان این گیرنده در دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان صورت پذیرفت تا اهمیت بیان آن را در پیشرفت دیسپلازی و ایجاد کارسینوم در حفره دهان بررسی نماییم. در مطالعه ما، بین گروه دیسپلازی و گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به لحاظ میانگین درصد سلول‌های رنگ گرفته و نیز طبقه‌بندی نیمه کمی درصد سلول‌های رنگ گرفته برای گیرنده اندوتلین A (ETA)، تفاوت آماری معناداری وجود داشت و میانگین درصد سلول رنگ گرفته در گروه کارسینوم سلول سنگفرشی دهان به‌طور معنی‌داری از گروه دیسپلازی بیش‌تر بود که

نشان دهنده این است که گیرنده اندوتلین A (ETA) احتمالاً در پیشرفت دیسپلازی به سمت کارسینوم سلول سنگفرشی و ایجاد کانسر در حفره دهان دخیل است. هم‌چنین نتایج مطالعه ما نشان داد که به لحاظ طبقه‌بندی نیمه کمی درصد سلول‌های رنگ گرفته، بین گروه دیسپلازی خفیف و متوسط و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد، به گونه‌ای که نمونه‌های کارسینوم، درصد رنگ‌پذیری بالاتری در مقایسه با دیسپلازی خفیف و متوسط نشان دادند؛ این در حالی بود که تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه دیسپلازی شدید و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان وجود نداشت. این یافته حاکی از آن است که بیان گیرنده اندوتلین A در دیسپلازی خفیف و متوسط پایین بوده و هرچه به سمت دیسپلازی شدید و کارسینوم پیش می‌رویم، بیان آن بیش‌تر شده و می‌تواند حاکی از دخالت این پروتئین گیرنده در پیشرفت از دیسپلازی خفیف به سمت دیسپلازی شدید و کارسینوم باشد.

در مطالعه ما به لحاظ شدت رنگ‌پذیری برای گیرنده اندوتلین A (ETA) نیز تفاوت آماری معنی‌داری بین مخاط دیسپلاستیک دهان و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مشاهده شد که باز هم موید وجود نقش برای گیرنده اندوتلین A (ETA) در پیشرفت دیسپلازی به سمت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و ایجاد کانسر در حفره دهان می‌باشد و حاکی از این است که افزایش بروز گیرنده اندوتلین A (ETA) در کارسینوم سلول سنگفرشی نسبت به مخاط دیسپلاستیک هم به صورت افزایش در درصد رنگ‌پذیری سلول‌ها و هم به صورت افزایش در شدت رنگ‌پذیری سلول‌ها برای این نشانگر خود را نشان می‌دهد.

Ishibashi و همکاران (۹) در مطالعه‌ای بررسی نمودند که آیا بروز پروتئین اندوتلین در کارسینوم سلول سنگفرشی مری، بافت دیسپلاستیک و مخاط نرمال مجاور می‌تواند یک فاکتور پروگنوستیک باشد یا نه. در مطالعه آن‌ها میزان رنگ‌پذیری بالای اندوتلین در مخاط

نرمال مجاور تومور با تهاجم به عروق لنفاوی، متاستاز به لنف نود ناحیه ای، متاستاز دور دست و نیز کاهش بقای بدون عود مرتبط بود. بروز بالای اندوتلین در بافت دیسپلاستیک با عود بالاتر تومور همراه بود. آن‌ها دریافتند که بیان بالای پروتئین اندوتلین، مستقل از دیگر فاکتورهای پروگنوستیک هیستولوژیک و بالینی، بقای بدون عود را در بیماران مبتلا به SCC مری کاهش می‌دهد. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که علاوه بر ریسک فاکتورهای هیستولوژیک شناخته شده و معیارهای طبقه بندی TNM، اندازه‌گیری بروز اندوتلین با یک آنالیز ایمونوهیستوشیمی ساده ممکن است به پیش بینی پروگنوز بیماران مبتلا به SCC مری کمک بیش‌تری نماید.

Awano و همکاران (۱۰) در مطالعه‌ای، محور اندوتلین را در سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی انسان بررسی نمودند. آن‌ها بروز اندوتلین-۱ (ET-1)، ریسپتور اندوتلین-A (ETAR)، ریسپتور اندوتلین-B (ETBR) و تمامی ایزوفرم‌های آنزیم تبدیل‌کننده اندوتلین-۱ (ECE-1) را در سلول‌های SCC دهان مشاهده نمودند، اما تنها بروز ET-1، ETBR و ECE-1 در مقایسه با کراتینوسیت‌های اپیدرمال نرمال انسان افزایش داشتند. ET-1 به تنهایی پرولیفراسیون سلول‌های SCC دهان را تحریک نمود. آنتاگونیست‌های ETAR و ETBR پرولیفراسیون با واسطه ET-1 را مهار نمودند. کاهش بروز ECE-1 بعد از مواجهه با ECE siRNA، از پرولیفراسیون سلول SCC کاست. هم‌چنین اثر آنتی‌پرولیفراتیو توسط مهار کردن فعالیت ECE با مهارکننده اختصاصی (ECE-i) مشاهده شد. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که تنظیم سیستم اندوتلین در سلول‌های SCC دهان ممکن است یک پروتکل درمانی جدید برای کانسر دهان فراهم کند.

Pickering و همکاران (۱۱) در مطالعه‌ای، اندوتلین-۱ بزاقی را در بیماران مبتلا به SCC دهان و نیز اندوتلین-۱ و mRNA اندوتلین-۱ را در نمونه‌های بافتی SCC دهان و اپی‌تلیوم نرمال دهان اندازه‌گیری نمودند. در مطالعه آن‌ها

سطح اندوتلین-۱ بزاقی به‌طور معنی‌داری در گروه SCC دهان نسبت به گروه کنترل بالاتر بود. در اندازه‌گیری اندوتلین-۱ بر روی بافت‌های SCC دهانی تازه به روش ELISA، سطح اندوتلین-۱ نسبت به نمونه‌های کنترل نرمال بالاتر بود. mRNA اندوتلین-۱ به‌طور معنی‌داری در ۸ مورد از ده نمونه SCC دهان بیش از حد بروز یافت. در رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی، رنگ‌پذیری سیتوپلاسمیک هوموژن قوی برای اندوتلین-۱ در سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی در تمامی مقاطع تومورال مشاهده شد. یافته‌های آن‌ها نشان‌دهنده بروز بیش از حد mRNA اندوتلین-۱ و افزایش بیان پروتئین اندوتلین-۱ در نمونه‌های SCC دهان و نیز افزایش معنی‌دار سطح اندوتلین-۱ بزاقی در بیماران مبتلا به کانسر دهان نسبت به گروه کنترل نرمال بود.

Hinsley و همکاران (۱۲) در مطالعه‌ای بر روی رده‌های سلولی (cell lines) کارسینوم سلول سنگفرشی سروگردن و فیروبلات‌های دهانی، توانایی اندوتلین-۱ (ET-1) برای تاثیر گذاری بر قدرت حرکت سلول‌های SCC سر و گردن را بررسی نمودند. آن‌ها مشاهده نمودند که اندوتلین-۱، مهاجرت سلول‌های SCC سر و گردن را در محیط کشت به صورت پاراکرین افزایش می‌دهد، بدین طریق که آزادسازی لیگاند‌های EGFR را از فیروبلات‌های دهانی با واسطه گری ADAM17 تحریک می‌کند که متعاقباً EGFR را بر روی سلول‌های کانسر فعال می‌نماید. هم‌چنین آن‌ها نقشی برای این مسیر در تحریک بیان COX-2 (به عنوان یک نشانگر پرولیفراستیک منفی در SCC سر و گردن) شناسایی نمودند. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که فعال شدن محور اندوتلین در SCC سر و گردن ممکن است به پیشرفت بیماری توسط تحریک قدرت حرکت سلول کانسر از طریق افزایش واکنش‌های متقابل اپی-تلیال-استرومال کمک کند. مطالعه ما نیز از نقش گیرنده اندوتلین A (به عنوان بخشی از محور اندوتلین) در پیشرفت مخاط دهان به سمت دیسپلازی و کارسینوم سلول سنگفرشی دهان

حمایت می‌کند و به نوعی در هماهنگی با یافته‌های مطالعه آن‌ها قرار دارد.

Ishimoto و همکاران (۳) در مطالعه‌ای، نقش مسیر سیگنال‌دهی گیرنده اندوتلین را در کارسینوم سلول سنگفرشی زبان با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی ارزیابی نمودند. آن‌ها دریافتند که هر دو گیرنده اندوتلین ET_B و ET_A در سلول‌های تومورال نمونه‌های کانسر زبان بیش از حد بروز می‌یابند. هم‌چنین ET_B و ET_A در رده‌های سلولی کارسینوم سلول سنگفرشی (SCC cell lines) کشت داده شده زبان و مری بیان شدند. در زمان مواجهه هر دو رده سلولی کشت داده شده با آنتاگونیست انتخابی ET_A (BQ123) یا یک آنتاگونیست انتخابی ET_B (BQ788)، مهار رشد سلولی مشاهده شد. یافته‌های مشابهی در زمان مواجهه رده‌های سلولی SCC با siRNA اختصاصی برای سرکوب ET_A و ET_B حاصل شد. به علاوه مهار مسیر فعال شده میتوزن پروتئین کیناز (MAP kinase) توسط درمان با آنتاگونیست‌های گیرنده اندوتلین و siRNA مشاهده گردید. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که مسیر سیگنال‌دهی اندوتلین ممکن است تا حدودی نقش مهمی در رشد سلولی در SCC از طریق مسیر MAP کیناز ایفا نماید.

Alaizari و همکاران (۲) در مطالعه‌ای، بیان ایمونوهیستوشیمیایی و توزیع پروتئین اندوتلین-۱ را در کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی (OSCC) ارزیابی و رابطه بیان اندوتلین-۱ را با درجه تمایز هیستوپاتولوژیک و نیز وضعیت متاستاز ناحیه‌ای کارسینوم سلول سنگفرشی دهان بررسی نمودند. ایمونوراکتیویتی در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد. در مقایسه مقادیر دانسیته نوری برای بروز اندوتلین-۱ در درجات تمایز هیستوپاتولوژیک متفاوت کارسینوم سلول سنگفرشی دهانی، OSCC با تمایز ضعیف (Poorly differentiated) به‌طور معنی‌داری بیان بیش‌تری را نسبت به OSCC های با تمایز متوسط (moderately differentiated) نشان دادند که خود به‌طور معنی‌داری بیان بیش‌تری نسبت به OSCC های

خوب تمایز یافته (well-differentiated) داشتند. به علاوه بروز اندوتلین-۱ در OSCC های متاستاتیک نسبت به OSCC های غیر متاستاتیک بالاتر بود. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که افزایش بروز اندوتلین-۱ می‌تواند رفتار تهاجمی OSCC با تمایز ضعیف (Poorly differentiated)، خصوصاً متاستاز را افزایش دهد و بنابراین اندوتلین-۱ می‌تواند یک هدف (target) درمانی در OSCC باشد. نتایج حاصل از مطالعه ما نیز به نوعی با یافته‌های مطالعه آن‌ها همخوانی دارد، چرا که در مطالعه ما نیز افزایش بروز گیرنده اندوتلین A (به عنوان بخشی از محور اندوتلین) در تمام نمونه‌های کارسینوم سلول سنگفرشی مشاهده شد.

Salem و همکاران (۸) در مطالعه‌ای، بیان ایمونوهیستوشیمیایی اندوتلین ۱ را در پسروریازیس، کارسینوم سلول بازال و کارسینوم سلول سنگفرشی پوست ارزیابی نمودند. آن‌ها مشاهده نمودند که اندوتلین ۱ و گیرنده اندوتلین A در تمام بیماران مبتلا به SCC پوست و پسروریازیس، با فراوانی و درجه بالاتری نسبت به گروه شاهد و کارسینوم سلول بازال حضور داشتند. آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که فراوانی و درجه بالاتر بیان اندوتلین ۱ و گیرنده اندوتلین A در پسروریازیس و SCC در مقایسه با کارسینوم سلول بازال و گروه شاهد دلالت بر دخالتشان در پرولیفراسیون کراتینوسیت در هر دو بیماری می‌باشد و این که گیرنده اندوتلین A، گیرنده عمدتاً بروز یافته در پسروریازیس و SCC است.

Cong و همکاران (۱۳) در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶، به بررسی نقش ET-1 و گیرنده هایش در مهاجرت سلولی و تهاجم هپاتوسلولار کارسینوما پرداختند. آن‌ها یافتند که گیرنده ET_A به میزان زیادی در سلول‌ها و بافت‌های هپاتوسلولار کارسینوما بیان شد. بروز گیرنده ET_A و نیز بیان ET-1 با تهاجم عروقی و stage تومور در هپاتوسلولار کارسینوما مرتبط بود. فعال کردن گیرنده ET_A توسط ET-1 به صورتی وابسته به دوز، مهاجرت سلولی و تهاجم سلول‌های هپاتوسلولار کارسینوما

سنگفرشی دهان و بررسی مسیر سیگنال دهی بعد از فعال شدن گیرنده اندوتلین A می باشد. در مجموع با توجه به افزایش معنی دار بروز گیرنده ET_A در کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نسبت به دیسپلازی دهانی، احتمالاً بیان بالای این گیرنده با پیشرفت از دیسپلازی به سمت کارسینوم سلول سنگفرشی دهان مرتبط می باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از یک طرح تحقیقاتی (کد: ۳۸۴۳) بود که از طرف دانشگاه علوم پزشکی بیرجند مورد حمایت قرار گرفت. بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند بابت حمایت از این مطالعه تشکر می کنیم. از بخش پاتولوژی بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران و بالاحص سرکار خانم دکتر فروغی نیز تقدیر و تشکر می گردد.

References

- Hoffmann RR, Yurgel LS, Campos MM. Endothelins and their receptors as biological markers for oral cancer. *Oral Oncol* 2010; 46(9): 644-647.
- Alaizari NA, Abdelbary SN, Amin NR. Immunohistochemical expression of endothelin protein in oral squamous cell carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol* 2013; 56(2): 151-154
- Ishimoto S, Wada K, Tanaka N, Yamanishi T, Ishihama K, Aikawa T, et al. Role of endothelin receptor signalling in squamous cell carcinoma. *Int J oncol* 2012; 40(4): 1011- 1019.
- Bagnato A, Natali PG. Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med* 2004; 2(1): 16.
- Papanikolaou S, Bravou V, Papadaki H, Gyftopoulos K. The role of the endothelin axis in promoting epithelial to mesenchymal transition and lymph node metastasis in prostate adenocarcinoma. *Urol Ann* 2017; 9(4): 372-379.
- Shi L, Zhou SS, Chen WB, Xu L. Functions of endothelin-1 in apoptosis and migration in hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med*. 2017;13(6):3116-3122.
- Wülfing P, Tio J, Kersting C, Sonntag B, Buerger H, Wülfing C, et al. Expression of endothelin-A-receptor predicts unfavourable response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Br J Cancer* 2004; 91(3): 434-440.
- Salem SA, Gamal Aly D, Salah Youssef N, Moneim El-Shaer MA. Immunohistochemical assessment of endothelin-1 axis in psoriasis, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *G Ital Dermatol Venereol* 2015; 150(3): 283-291.

9. Ishibashi Y, Hanyu N, Nakada K, Suzuki Y, Yamamoto T, Takahashi T, et al. Endothelin protein expression as a significant prognostic factor in oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2003; 39(10): 1409-1415.
10. Awano S, Dawson LA, Hunter AR, Turner AJ, Usmani BA. Endothelin system in oral squamous carcinoma cells: Specific siRNA targeting of ECE 1 blocks cell proliferation. *Int J Cancer* 2006; 118(7): 1645-1652.
11. Pickering V, Jordan RC, Schmidt BL. Elevated salivary endothelin levels in oral cancer patients-a pilot study. *Oral Oncol* 2007; 43(1): 37-41.
12. Hinsley EE, Hunt S, Hunter KD, Whawell SA, Lambert DW. Endothelin 1 stimulates motility of head and neck squamous carcinoma cells by promoting stromal-epithelial interactions. *Int J Cancer* 2012; 130(1): 40-47.
13. Cong N, Li Z, Shao W, Li J, Yu S. Activation of ETA receptor by endothelin-1 induces hepatocellular carcinoma cell migration and invasion via ERK1/2 and AKT signaling pathways. *J Membr Biol* 2016; 249(1-2): 119-128.