Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

Comparison of Nucleus and Cytoplasm Diameter of Buccal Mucosa Cells in Cigarette Smokers and Nonsmokers: A Cytomorphometric Study using Feulgen and Papanicolaou Stains

Mohammad Javad Hassanzadeh[1], **Noushin Jalayer Naderi**[1*]

[1] Dept of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 03 November 2021
Revised: 24 April 2022
Accepted: 07 June 2022
Published Online: 21 January 2023

**** Correspondence to:***
Noushin Jalayer Naderi
Dept of Oral and Maxillofacial Pathology, Faculty of Dentistry, Shahed University, Tehran, Iran.
Email:
jalayer@shahed.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction: A decrease in cell size and an increase in nuclear dimension due to changes in the amount of DNA could be an indicator of early detection of malignant changes. This study aimed to compare the nuclear and cytoplasmic diameters of buccal mucosa cells in cigarette smokers and nonsmokers in a cytomorphometric study using Feulgen and Papanicolaou stains.

Material & Methods: In this case-control study, cytological smears of human buccal mucosa cells stained with Feulgen and Papanicolaou of 30 smokers and 15 controls who had never smoked were compared regarding the cytoplasm size and nucleus diameter. Moreover, the difference among the mean values of the cytoplasm size, nucleus diameter, and nucleus-to-cytoplasm ratio in the case and control samples regarding the Feulgen and Papanicolaou stained slides were analyzed using the Independent Samples t-Test.
(Ethic code: IR.SHAHED.REC.1399.127)

Findings: The mean cytoplasm size of smokers stained with Feulgen was significantly higher than that of Papanicolaou-stained samples in smokers (P=0.01). There was no significant difference between the mean diameter of the nucleus and the nucleus-to-cytoplasm ratio of smokers stained with Feulgen and Papanicolaou (P=0.2 and P=0.1, respectively).

Discussion & Conclusion: In buccal mucosa cells of cigarette smokers, Feulgen and Papanicolaou staining methods had the same outcomes in demonstrating the morphometric changes of the nucleus; however, there were no differences in revealing cytoplasm diameter.

Keywords: Buccal mucosa, Cigarette smoking, Cytology, Smoking

➢ **How to cite this paper**
Hassanzadeh M J, Jalayer Naderi N. Comparison of Nucleus and Cytoplasm Diameter of Buccal Mucosa Cells in Cigarette Smokers and Nonsmokers: A Cytomorphometric Study using Feulgen and Papanicolaou Stains. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(6): 52-60.

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

مقایسهٔ قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم سلول‌های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری: بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولائو

محمدجواد حسن‌زاده[۱]، **نوشین جلایر نادری**[۱*]

[۱] گروه آسیب شناسی دهان و فک، دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۲/۰۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۱۷
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱

نویسنده مسئول:
نوشین جلایر نادری
گروه آسیب شناسی دهان و فک ، دانشکده دندان پزشکی ، دانشگاه شاهد ، تهران ، ایران.

Email:
jalayer@shahed.ac.ir

چکیده

مقدمه: کاهش اندازهٔ سلول و افزایش قطر هسته که ناشی از تغییر میزان DNA در هسته است، می‌تواند شاخصی برای نمایش زودرس تغییرات بدخیمی باشد. هدف از مطالعهٔ حاضر مقایسهٔ اندازهٔ سیتوپلاسم و قطر هستهٔ سلول‌های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری در یک بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولائو بود.

مواد و روش ها: در این مطالعهٔ مورد-شاهدی، اسمیرهای سیتولوژیک مخاط باکال رنگ‌شده با رنگ‌های هیستوشیمیایی فلوگن و پاپانیکولائو به‌دست‌آمده از ۳۰ فرد سیگاری با ۱۵ نمونهٔ کنترل، از نظر قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم مقایسه شدند. تفاوت میانگین اندازهٔ سلول، میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم گروه‌های مورد و شاهد در رنگ‌آمیزی‌های فلوگن و پاپانیکولائو با آزمون Independent Samples t-Test آنالیز گردید.

یافته‌ها: میانگین اندازهٔ سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با فلوگن به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولائو بود (P=0.01). میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با فلوگن و پاپانیکولائو تفاوت معناداری نداشت (به‌ترتیب P=0.2 و P=0.1).

بحث و نتیجه‌گیری: در سلول‌های مخاط باکال افراد سیگاری، رنگ‌آمیزی فلوگن و پاپانیکولائو در نمایش تغییرات مرفومتریک هسته عملکرد مشابهی دارند؛ اما نتایج یکسانی در نمایش اندازهٔ سیتوپلاسم ندارند.

واژه‌های کلیدی: دخانیات، سیگار، سیتولوژی، مخاط باکال

استناد: حسن زاده، محمد جواد؛ جلایر نادری، نوشین. مقایسهٔ قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم سلول‌های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری: بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولائو. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، بهمن ۱۴۰۱؛۳۰(۶): ۶۰-۵۲.

CC BY NC

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / اسفند ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۱۱۲، ۵۲-۶۰

مقدمه

عوامل شیمیایی مختلف قادرند سبب سمیت سلولی و بروز تغییرات ژنوتوکسیک و سیتوتوکسیک در سلول‌ها شوند. این تغییرات با افزایش تعداد میکرونوکلئوس ها در هسته و پدیده‌های کاریولیز، کاریورکسی و پیکنوز مشخص می‌شوند (۱). مطالعات نشان داده‌اند که کشیدن سیگار سبب بروز تغییرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک در سلول‌های مخاط باکال انسان می‌گردد. کشیدن سیگار با افزایش تعداد میکرونوکلئوس ها در هسته (۲-۴) و افزایش میزان کاریولیز، کاریورکسی و پیکنوز همراه است (۵-۹). علاوه بر تعداد میکرونوکلئوس‌ها و تغییرات آپوپتوتیک که نشان‌دهندهٔ تغییر به‌سوی بدخیمی و مرگ سلول است، مؤلفه‌های مرفومتریک تعریف‌شده در بررسی کمی نمونه‌های اکسفولیاتیو مانند اندازهٔ هسته، اندازهٔ سلول، نسبت هسته به سیتوپلاسم و شکل سلول نیز در تعیین ریسک ابتلا به ضایعات پیش‌بدخیم اپی‌تلیالی تعیین‌کننده هستند (۱۰).

افزایش قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم به‌ترتیب نشان‌دهندهٔ افزایش میزان DNA هسته و تغییر اندازهٔ هسته است (۱۲، ۱۱). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اندازهٔ قطر هسته از مخاط طبیعی به‌سوی کارسینوم سلول سنگ‌فرشی دهان بیشتر می‌شود و قطر سیتوپلاسم کاهش می‌یابد. محققین بر این باورند که کاهش اندازهٔ سلول و افزایش اندازهٔ هسته که ناشی از تغییر میزان DNA در هسته است، می‌توانند به‌عنوان شاخصی برای نمایش زودرس تغییرات بدخیمی به‌کار روند (۱۳).

بیومانیتورینگ سلول‌های مخاط باکال افراد در معرض عوامل ژنوتوکسیک، روشی ساده و قابل‌اعتماد برای بررسی افراد مستعد ابتلا به ضایعات پیش‌بدخیم و سرطان است (۱۶-۱۴). ارزیابی صدمات سیتوژنتیک در مخاط باکال روشی ساده است که نشان می‌دهد سلول‌ها در معرض خطر ابتلا به سرطان هستند. با استفاده از روش سیتولوژی اکسفولیاتیو، کشف زودرس تغییرات پیش‌بدخیم ساده‌تر می‌شود (۹). مطالعات سیتولوژی اکسفولیاتیو به‌سبب روش ساده‌تر و پایایی و روایی نتایج، در مقایسه با سایر روش‌های تشخیص ضایعات پیش‌بدخیم همانند بیوپسی، بیومارکرها، DNA پلوییدی و روش‌های اپتیکال که گران‌ترند و روش پیچیده‌تری دارند، اخیراً بسیار موردتوجه قرار گرفته‌اند.

تعداد مصرف‌کنندگان تنباکو در بیماران مبتلا به کارسینوم دهان چهار برابر بیشتر از جمعیت طبیعی است. خطر ایجاد دومین سرطان اولیه در بخش فوقانی دستگاه گوارش بیماران با سرطان درمان‌شده که همچنان استعمال سیگار را ادامه می‌دهند، ۲ تا ۶ برابر بیشتر از کسانی است که پس از تشخیص، این عادت را کنار گذاشته‌اند (۱۷). مطالعات نشان داده‌اند که سیگار ریسک فاکتور ژنوتوکسیک و سیتوتوکسیک در بروز تغییرات هسته است. رنگ‌های هیستوشیمیایی به‌کاررفته در نمایش این تغییرات می‌توانند سبب به‌دست آمدن نتایج مثبت/منفی کاذب شوند. تحقیق نرزسیان و همکاران حتی به‌طور واضح‌تری نشان داده است که رنگ‌های هیستوشیمیایی معمول مانند گیمسا، در مقایسه با یک رنگ اختصاصی DNA مانند فلوگن، در نمایش تغییرات هسته عملکرد ضعیف‌تری دارند (۱).

به‌سبب سهولت کار با رنگ پاپانیکولائو، محققان تمایل دارند از این رنگ برای بررسی تغییرات هسته استفاده کنند (۱۶، ۱۱، ۱۰). استفاده از یک رنگ غیراختصاصی ممکن است با نتایج مخدوش‌کننده همراه باشد، درحالی‌که به‌کار بردن یک رنگ اختصاصی در بررسی سیتولوژیک می‌تواند زاویه‌ای از تغییرات هسته را مشخص کند که یک رنگ غیراختصاصی در نمایش آن کارایی لازم را ندارد. با لحاظ کردن اهمیت رنگ هیستوشیمیایی به‌کاررفته در نمایش تغییرات هسته، هدف از پژوهش حاضر مقایسهٔ اندازهٔ سیتوپلاسم و قطر هستهٔ سلول‌های مخاط باکال در افراد سیگاری و غیرسیگاری در یک بررسی سیتومرفومتریک با استفاده از رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولائو بود.

مواد و روش ها

مطالعهٔ حاضر به روش مورد-شاهدی انجام شد. با لحاظ کردن پژوهش پیشین (۷)، در بررسی با analysis

paired sample t-test power در نرم‌افزار PASS، با در نظر گرفتن α=0.05 و β=0.2، انحراف معیار ۱/۲۲ و اختلاف ۱/۵ درصد، نسبت گروه مورد به شاهد معادل ۲ به ۱ به‌دست آمد و حداقل حجم نمونه در گروه افراد سیگاری ۳۰ و گروه شاهد ۱۵ مورد محاسبه شد. این پژوهش در کمیتهٔ اخلاق دانشگاه شاهد با کد IR.SHAHED.REC.1399.127 به تصویب رسید. جامعهٔ آماری گروه مورد افراد سیگاری مراجعه‌کننده به دانشکدهٔ دندانپزشکی دانشگاه شاهد بودند. افراد گروه کنترل از میان افراد غیرسیگاری همین جامعهٔ آماری انتخاب شده‌اند. معیار ورود نمونه‌ها به مطالعه شامل موارد ذیل بود: ابتلا نداشتن به بیماری زمینه‌ای یا سیستمیک، استفاده نکردن از دارو و الکل، استفاده از رژیم غذایی مختلط و نداشتن رادیوگرافی دهان در ۶ ماه گذشته. به‌منظور حذف عوامل هورمونی و تغییرات سنی روی سلول‌های مخاط دهان، نمونه‌های اسمیر گروه مورد و شاهد از مردان در بازه سنی ۲۵ تا ۵۰ سال انتخاب شدند (۷). معیار ورود مطالعه شامل افرادی بود که میزان سیگار کشیدن آنان بر اساس فرمول Packs×Year، معادل ۵ تا ۳۰ نخ سیگار در روز است و دست‌کم به مدت ۱۰ سال سیگاری بودند.

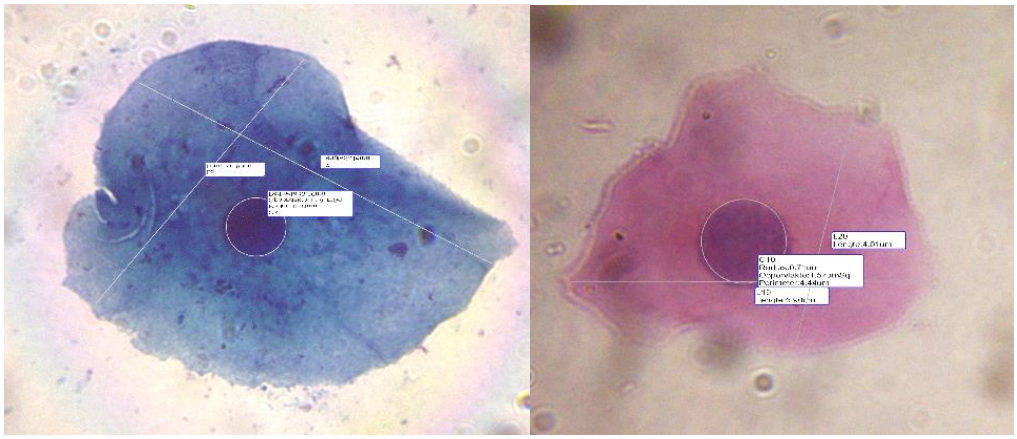
از افراد گروه‌های مورد و شاهد خواسته شد پیش از نمونه‌گیری، ۲ بار دهانشان را با آب شستشو دهند؛ سپس برای تهیهٔ اسمیرسیتولوژیک، سلول‌های مخاط باکال توسط اسپاتول پلاستیکی یک‌بارمصرف از روی سطح مخاط گونه برداشته شد. نمونه‌های تهیه‌شده از گونهٔ سمت چپ با رنگ فلوگن و نمونه‌های گونهٔ سمت راست با رنگ پاپانیکولائو رنگ گردید. سلول‌های به‌دست‌آمده روی لام شیشه‌ای پخش شدند و بلافاصله در فیکساتیو متانول و اسید استیک glacid به نسبت ۳/۱، مرحلهٔ ثبوت را طی کردند. نمونه‌های تهیه‌شده به روش تغییریافتهٔ توماس (Modified Thomas) با فلوگن رنگ گردیدند. در این روش، اسلایدها برای ۱۰ دقیقه در 1 N HCL در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند و برای ۳ دقیقه در آب مقطر شسته شدند؛ سپس اسمیرها با معرف شیف برای حدود ۹۰ دقیقه رنگ گردیدند و برای ۱۰ دقیقه با آب جاری شسته شدند. اسمیرها ۳ بار در حلال سدیم متا بی سولفیت نیم‌درصد غوطه‌ور گردیدند و بعد با آب جاری شسته شدند. اسمیرها توسط رنگ سبز روشن (Light Green) یک درصد رنگ گردیدند و برای بررسی میکروسکوپی مانت شدند (۱۸).

برای رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو از روش روتین استفاده گردید. اسلایدها به مدت ۲ دقیقه، به‌ترتیب در الکل‌های ۷۰ درصد و ۵۰ درصد قرار گرفتند؛ سپس با آب شسته و به مدت ۴ دقیقه در هماتوکسیلین گذاشته شدند. پس از شستشو به مدت ۵ ثانیه، در اسید الکل قرار گرفتند. پس از دهیدره شدن در الکل مطلق، به مدت ۱۰ ثانیه با orange G رنگ گردیدند. استفاده از EA 50 PAP reagent، الکل مطلق، گزیلل و مانت شدن مراحل نهایی آماده‌سازی نمونه‌ها بودند.

در بررسی نمونه‌ها، سلول‌های بدون همپوشانی که بهترین کیفیت رنگ‌آمیزی و حاشیه و هستهٔ واضح و مشخص داشتند، برای بررسی قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم انتخاب شدند. قطر سلول و اندازهٔ هسته ۵۰۰ سلول از هر نمونه تحت بزرگنمایی ×1000 با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS BX40) مجهز به دوربین دیجیتال (Sony ExWaveHAD, Model No. SSC-DC58AP; Tokyo,japan) اندازه‌گیری گردید (شکل شمارهٔ ۱). برای هر اسلاید، اندازهٔ سلول (حاصل‌ضرب بزرگ‌ترین اقطار طولی و عرضی سلول) به میکرومترمربع، قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم به واحد میکرومتر تعیین شد (۱۹).

در بررسی آماری نمونه‌ها از Independent Samples t-test در سطح احتمال P<0.05، برای آنالیز معنی‌دار بودن تفاوت میانگین اندازهٔ سلول، میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم گروه‌های مورد و شاهد استفاده شد. برای بررسی آماری از بستهٔ نرم‌افزاری SPSS vol.24 استفاده گردید.

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام / اسفند ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۱۲۰، ۵۲-۶۰



الف ب

شکل شمارهٔ ۱. الف. تعیین قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم سلول مخاط باکال فرد سیگاری (رنگ‌آمیزی فلوگن ×1000)؛ ب. تعیین قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم سلول مخاط باکال فرد غیرسیگاری (رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو ×1000)

یافته ها

میانگین سنی افراد سیگاری ۱۰/۸±۳۵/۸ سال و افراد غیرسیگاری ۳/۹±۲۸/۹ سال بود. جدول شمارهٔ ۱ میانگین قطر هسته، اندازهٔ سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم را در افراد سیگاری و غیرسیگاری با رنگ‌آمیزی‌های فلوگن و پاپانیکولائو نشان می‌دهد.

آزمون Independent Samples t-test نشان داد که قطر هسته، اندازهٔ سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری و غیرسیگاری در رنگ‌آمیزی فلوگن (به‌ترتیب P=0.3، P=0.6 و P=0.7) تفاوت معنی‌دار ندارد. در نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولائو قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم افراد غیرسیگاری بیشتر از افراد سیگاری بود (به‌ترتیب P=0.007 و P=0.04). میانگین نسبت هسته به سیتوپلاسم میان دو گروه تفاوت نداشت (P=0.7).

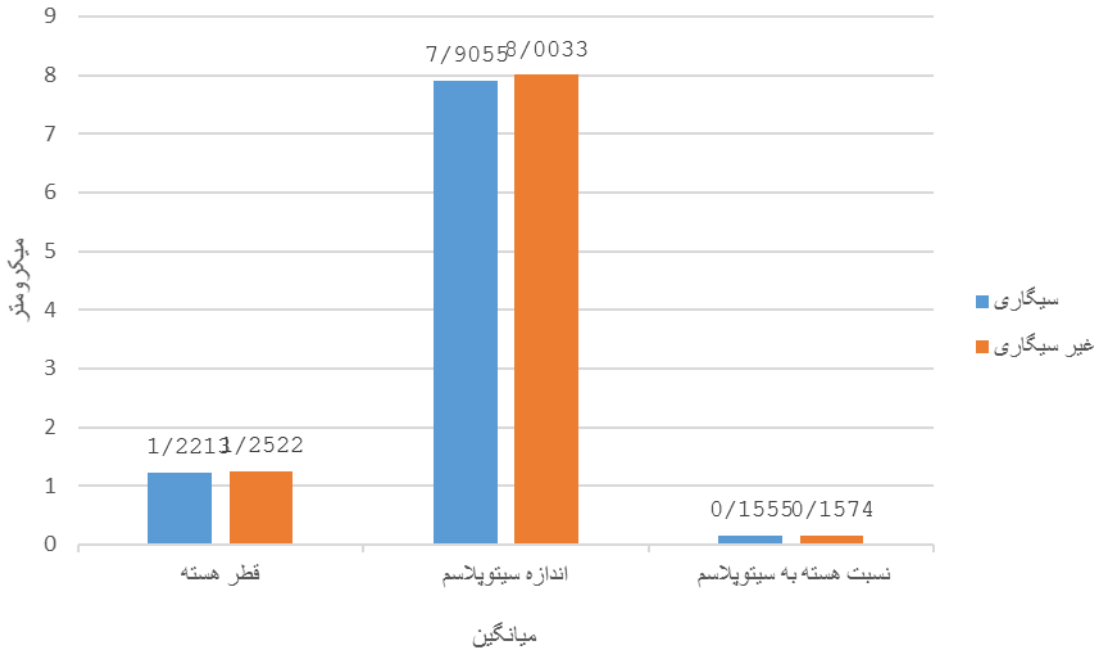
مقایسهٔ نمونه‌های رنگ‌شدهٔ فلوگن و پاپانیکولائو با آزمون Independent Samples t-test در شکل شمارهٔ ۱ نشان داد که میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با فلوگن و نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولائو تفاوت معناداری ندارد (به‌ترتیب P=0.2 و P=0.1). میانگین اندازهٔ سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با فلوگن به‌طور معنی‌دار، بیشتر از نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولائو بود (P=0.01).

میانگین قطر هسته، اندازهٔ سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های غیرسیگاری رنگ‌شده با فلوگن و نمونه‌های غیرسیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولائو تفاوت معناداری نداشتند (به‌ترتیب P=0.4، P=0.9 و P=0.5). شکل های شمارهٔ ۲ و ۳ مقایسه میانگین مؤلفه های مرفومتریک گروه‌های سیگاری و غیرسیگاری در رنگ‌آمیزی فلوگن و پاپانیکولائو را نشان می‌دهند.

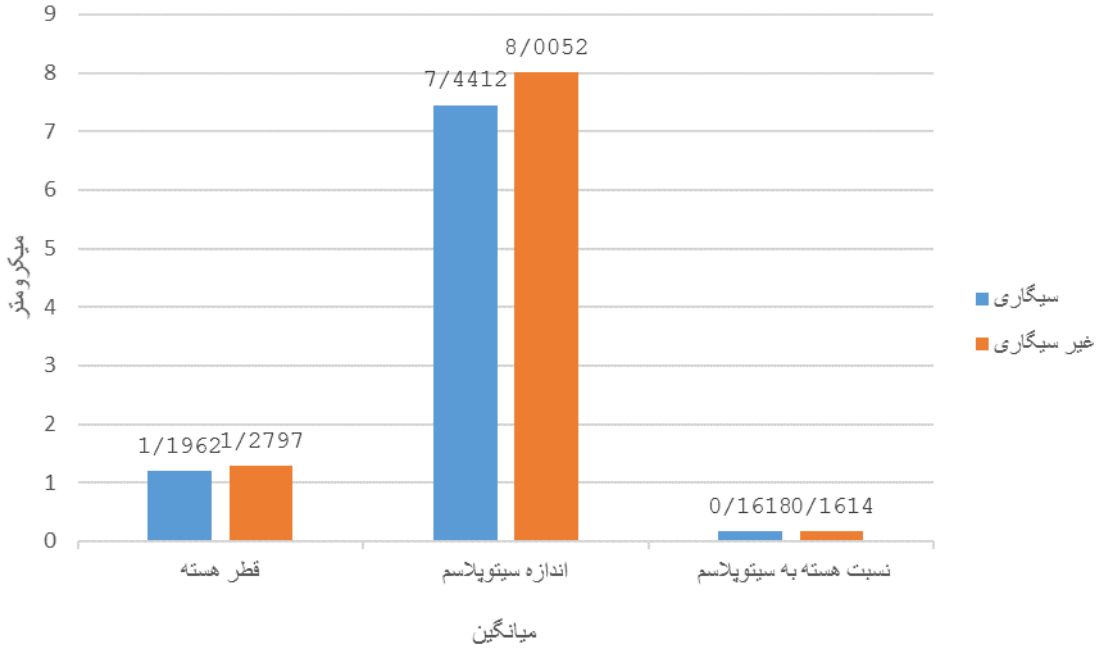
جدول شمارهٔ ۱. میانگین قطر هسته، اندازهٔ سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم افراد سیگاری و غیرسیگاری در رنگ‌آمیزی‌های فلوگن و پاپانیکولائو *

گروه	پاپانیکولائو		فلوگن			
	نسبت هسته به سیتوپلاسم	اندازهٔ سیتوپلاسم*	قطر هسته	نسبت هسته به سیتوپلاسم	اندازهٔ سیتوپلاسم*	قطر هسته
سیگاری	0.16±0.01	7.44±0.62	1.19±0.06	0.15±0.01	7.90±0.72	1.22±0.09
غیرسیگاری	0.16±0.017	8.00 ±0.96	1.27±0.10	0.15±0.01	8.00±0.77	1.25±0.08

*واحد به میکرومترمربع است.



شکل شمارهٔ ۲. میانگین مؤلفه‌های مرفومتریک گروه سیگاری و غیرسیگاری در رنگ‌آمیزی فلوگن



شکل شمارهٔ ۳. میانگین مؤلفه‌های مرفومتریک گروه سیگاری و غیرسیگاری در رنگ آمیزی پاپانیکولائو

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه نشان داد، میانگین اندازهٔ سیتوپلاسم در افراد غیرسیگاری در مقایسه با افراد سیگاری بزرگ‌تر و قطر هسته کوچک‌تر است؛ اما میانگین قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم میان افراد سیگاری و غیرسیگاری در نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن تفاوت معنی‌داری نداشت. در نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولائو، اندازهٔ سیتوپلاسم افراد غیرسیگاری بزرگ‌تر از افراد سیگاری بود. مقایسهٔ نمونه‌های رنگ‌شدهٔ فلوگن و پاپانیکولائو نشان داد که میانگین اندازهٔ سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با فلوگن به‌طور معنی‌دار، بیشتر از نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولائو است.

قطر هستهٔ سلول‌های بدخیم به‌سبب افزایش مواد موردنیاز برای نسخه‌برداری افزایش می‌یابد؛ اما از سوی دیگر، توانایی تولید سیتوپلاسم توسط این سلول‌ها پایین

می‌آید. کاهش اندازهٔ سلول و افزایش اندازهٔ هسته که ناشی از تغییر میزان DNA در هسته است، می‌تواند شاخصی برای نمایش زودرس تغییرات بدخیمی باشد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از تنباکوی غیرتدخینی سبب کاهش معنی‌دار قطر سلول و افزایش قطر هسته می‌شود (۲۱، ۲۰، ۱۱، ۱۰). همسو با مطالعات پیشین، یافته‌ها نشان داد که میانگین اندازهٔ سیتوپلاسم در افراد غیرسیگاری در مقایسه با افراد سیگاری بزرگ‌تر و قطر هسته کوچک‌تر است؛ اما میانگین قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم میان افراد سیگاری و غیرسیگاری در نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن تفاوت معنی‌داری نداشت. تفاوت یافته‌ها می‌تواند ناشی از ترکیبات متفاوت مواد تدخینی موجود در سیگار و تنباکوی غیرتدخینی، مدت‌زمان بیشتر مجاورت تنباکوی غیرتدخینی با مخاط و اصطکاک ناشی از این مواد روی مخاط دهان باشد. این تفاوت نشان می‌دهد که تغییرات هسته و سیتوپلاسم در افرادی که از تنباکوی غیرتدخینی استفاده می‌کنند، بارزتر است. ازآنجاکه در حین تبدیل یک سلول طبیعی سالم به سلولی با تغییرات بدخیمی، به‌تدریج هستهٔ سلول بزرگ‌تر و سیتوپلاسم کوچک‌تر می‌شود، می‌توان احتمال داد که اثر کارسینوژنیک تنباکوی غیرتدخینی بر سلول زودتر از سیگار مشاهده می‌گردد.

در نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولائو، اندازهٔ سیتوپلاسم افراد غیرسیگاری به‌طور معنی‌دار بیشتر از افراد سیگاری بود. این یافته با مطالعات پیشین مطابقت دارد که در آن‌ها از رنگ پاپانیکولائو در نمایش تغییرات هسته و سیتوپلاسم مخاط باکال افراد سیگاری و مصرف‌کنندگان تنباکو استفاده‌شده بود (۲۱، ۱۰). برخلاف آن، مطالعهٔ یامالا و همکاران با استفاده از رنگ پاپانیکولائو نشان داد که قطر سیتوپلاسم در افراد سیگاری با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد (۲۲). تفاوت در یافته‌ها می‌تواند ناشی از روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی، اختلاف در تعداد سلول‌های شمارش‌شده و دقت ابزار اندازه‌گیری باشد. بدیهی است، مطالعات اخیر به‌سبب بهره‌گیری از ابزارهای دقیق‌تر با نتایج پایاتر همراه‌اند. برخلاف نتایج به‌دست‌آمده با رنگ‌آمیزی پاپانیکولائو، میانگین قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم میان افراد سیگاری و غیرسیگاری در نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن تفاوت معنا داری نداشت. منبعی برای مقایسهٔ این نتیجه در رنگ‌آمیزی فلوگن به‌دست نیامد.

استفاده از رنگ هیستوشیمیایی نامناسب در نمایش تغییرات هسته می‌تواند سبب نتایج مخدوش‌کنندهٔ مثبت یا منفی کاذب شود. رنگ‌های هیستوشیمیایی معمول مانند گیمسا، در مقایسه با یک رنگ اختصاصی DNA مانند فلوگن، در نمایش تغییرات هسته عملکرد ضعیف‌تری نشان داده‌اند (۱). استفاده از یک رنگ هیستوشیمیایی مناسب در بررسی سیتولوژیک هسته و مشاهدهٔ تغییرات بدخیمی آن اهمیت فراوانی دارد. در این مطالعه دقت رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولائو در نمایش تغییرات سیتومرفومتریک سلول مقایسه شد. میانگین قطر هسته، اندازهٔ سیتوپلاسم و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های غیرسیگاری رنگ‌شده با فلوگن و نمونه‌های غیرسیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولائو تفاوت معناداری نداشت. این یافته نشان می‌دهد که رنگ‌های فلوگن و پاپانیکولائو در نمایش ابعاد هسته و سلول گروه کنترل که در معرض عامل کارسینوژن نبوده‌اند، مشابه عمل کرده‌اند. در گروه سیگاری تفاوت معنی‌داری میان میانگین قطر هسته و نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن و نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولائو وجود نداشت؛ اما میانگین اندازهٔ سیتوپلاسم نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن به‌طور معنی‌دار، بیشتر از نمونه‌های رنگ‌شده با پاپانیکولائو بود. ازآنجاکه میانگین قطر هسته در نمونه‌های رنگ‌شده با فلوگن و پاپانیکولائو تفاوت معنی‌داری نداشت، می‌توان نتیجه گرفت که کشیدن سیگار در این مطالعه تغییر معنی‌داری در محتوای DNA هستهٔ افراد سیگاری ایجاد نکرده است. این یافته با نتایج به‌دست‌آمده از رنگ‌آمیزی قطر هسته و اندازهٔ سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری و غیرسیگاری با فلوگن هماهنگ است. ازآنجاکه قطر هسته میان دو رنگ‌آمیزی تفاوت معنی‌داری ندارد، وسعت بیشتر سیتوپلاسم در رنگ‌آمیزی فلوگن نشان‌دهندهٔ دقت این رنگ در نمایش تغییرات موجود است؛ زیرا نشان

می‌دهد، فضایی از ابعاد حقیقی سیتوپلاسم در مقابل افزایش قطر هسته کاهش نیافته است. بر اساس مشاهدات موجود، فلوگن سبب وضوح مشاهده تغییرات DNA در هسته می‌شود، درحالی‌که هسته در رنگ‌آمیزی با پاپانیکولائو پهن‌تر به نظر می‌رسد و حاشیهٔ واضحی ندارد (۲۳). در متد فلوگن، رنگ شیف سبب نمایش داکسی ریبونوکلئوپروتیین می‌گردد و کروماتین رنگ می‌گیرد؛ بدین سبب، هسته به‌وضوح مشاهده می‌شود و ابعاد آن با سهولت بیشتری قابل‌اندازه‌گیری خواهد بود. نسبت هسته به سیتوپلاسم در تبدیل سلول‌های خوش‌خیم به‌سوی بدخیم افزایش می‌یابد؛ اما در این مطالعه، نسبت هسته به سیتوپلاسم نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با فلوگن و نمونه‌های سیگاری رنگ‌شده با پاپانیکولائو تفاوت معنی‌داری نداشت.

مهم‌ترین محدودیت مطالعهٔ حاضر نبودِ وحدت رویه در تعداد سلول‌های شمارش‌شدهٔ مطالعات پیشین است. شمارش سلولی در مطالعات مختلف از ۱۰۰ تا ۲۰۰ سلول متفاوت بود. ازآنجاکه افزایش شمارش سلول می‌تواند روایی مطالعه را افزایش دهد، بر اساس مطالعات مرفومتریک پیشین، در این مطالعه ۵۰۰ سلول در هر نمونه بررسی شد (۲۴، ۷). یافته‌های مطالعه نشان داد، میانگین قطر سیتوپلاسم در افراد غیرسیگاری در مقایسه با افراد سیگاری، بزرگ‌تر و قطر هسته کوچک‌تر است. ازآنجاکه بروز بدخیمی ناشی از کشیدن سیگار وابسته به دوز است، توصیه می‌شود در مطالعات آینده، تأثیر میزان کشیدن سیگار در ارتباط با تغییرات سیتومرفومتریک سلول بررسی گردد.

در سلول‌های مخاط باکال افراد سیگاری، رنگ‌آمیزی فلوگن و پاپانیکولائو در نمایش تغییرات مرفومتریک هسته عملکرد مشابهی دارند؛ اما نتایج یکسانی در نمایش اندازهٔ سیتوپلاسم نشان نمی‌دهند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان نامه دکتری عمومی دندان پزشکی نویسنده اول به شماره ۹۱۲ از دانشکده دندانپزشکی دانشگاه شاهد است. بدین وسیله از تمامی افرادی که در انجام این تحقیق یاری نموده اند تقدیر می گردد.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.SHAHED.REC.1399.127

References

1. Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, et al. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006; 15:1835-40. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0248.
2. Wu PA, Loh CH, Hsieh LL, Liu TY, Chen CJ, et al. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. Mutat Res 2004; 562:27-38. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.05.004.
3. Haveric A, Haveric S, Ibrulj S. Micronuclei frequencies in peripheral blood and buccal exfoliated cells of young smokers and non-smokers. Toxicol Mech Methods 2010; 20:260-6. doi: 10.3109/15376516.2010.482962.
4. Konopacka M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. Neoplasma 2003; 50:380-2.
5. Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, et al. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281: L509-16. doi: 10.1152/ajplung.2001.281.2.L509.
6. Comer DM, Elborn JS, Ennis M. Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetylaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells. BMC Pulm Med 2014; 14:32. doi: 10.1186/1471-2466-14-32.
7. Jalayer Naderi N, Pour Pasha M. Comparison of cytotoxic effect of cigarette and waterpipe smoking on human buccal mucosa. Int J Prev Med 2017; 8:98. doi: 10.4103/ijpvm.IJPVM_62_17.
8. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: Methods development. Mutat Res 1992; 271:69-77. doi: 10.1016/0165-1161(92)90033-i.
9. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, et al. Buccal micronucleus cytome assay. Nat Protoc 2009; 4:825-37. doi: 10.1038/nprot.2009.53.
10. Einstein TB, Sivapathasundharam B. Cytomorphometric analysis of the buccal mucosa of tobacco users. Indian J Dent Res 2005; 16:42-6.
11. Hande AH, Chaudhary MS. Cytomorphometric analysis of buccal mucosa of tobacco chewers. Rom J Morphol Embryol 2010; 51:527-32.
12. Cowpe JG, Longmore RB, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of abnormal oral mucosal smears. J R Soc Med 1988; 81:509-13. doi: 10.1177/014107688808100905.

13. Ramaesh T, Mendis BR, Ratnatunga N, Thattil RO. Cytomorphometric analysis of squames obtained from normal oral mucosa and lesions of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med 1998; 27:83-6. doi: 10.1111/j.1600-0714. 1998.tb02099. x.
14. Freitas MD, García–García A, Carneiro JLM, Crespo- Abeleira A, Gándara-Rey JM. Exfoliative cytology of the oral mucosa: a cytomorphometric comparison of healthy oral mucosa in oral cancer patients and healthy subjects. Revista Brasileira de Patologia Oral 2003; 2:2-6.
15. Navone R, Pentenero M, Gandolfo S. Liquid-based cytology in oral cavity squamous cell cancer. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2011; 19:77-81. doi: 10.1097/MOO.0b013e328343af10.
16. Udayashankar U, Guduru VS, Ananthaneni A, Ramisetty SD, Kuberappa PH, et al. Evaluation of cytomorphometric changes in tobacco users and diagnosed oral squamous cell carcinoma individuals. J Cytol 2016; 33:125-9. doi: 10.4103/0970-9371. 188047.
17. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. Oral and Maxillofacial Pathology.4th ed. Canada: Elsevier; 2016.
18. Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. Mutagenesis 2007; 22: 371-9. doi: 10.1093/mutage/gem029.
19. Metgud R, Gupta K, Prasad U, Gupta J. Cytomorphometric analysis of oral submucous fibrosis and leukoplakia using methyl green-pyronin Y, Feulgen staining and exfoliative brush cytology. Biotech Histochem 2015; 90:8-13. doi: 10.3109/105 20295.2014.919025.
20. Khot K, Deshmane S, Bagri-Manjarekar K, Warke D, Kotak K. A cytomorphometric analysis of oral mucosal changes in tobacco users. J Nat Sci Biol Med 2015; 6:S22-4. doi: 10.4103/0976-9668. 166055.
21. Nayyar AS, Kartheeki B, Sinha P, Zakaria KA, Chandrakant CR, et al. Cytomorphometric analysis of exfoliated buccal mucosal cells in smokers and tobacco chewers. Int J Histopathol Interpret 2017; 6:1-4. doi: 10.4103/ijhi.ijhi_4_17.
22. Syamala B, Chitturi RT, Chandrasekhar P, Prakash Chandra KL, Kumar KK, et al. Cytomorphometric analysis of exfoliated buccal cells to evaluate the malignant changes inindividuals with tobacco smoking and chewing habits. J NTR Uni Health Sci 2017; 6:143-8. doi: 10.4103/2277-8632.215530.
23. Biesterfeld S, Beckers S, Del Carmen Villa Cadenas M, Schramm M. Feulgen staining remains the gold standard for precise DNA image cytometry. Anticancer Res 2011; 31:53-8.
24. Jalayer naderi N. Response to letter to the editor: Is micronucleus assay suitable for cytogenetic biomonitoring the different ways to smoke? Iran J Pathol 2020; 15: 352-4. doi: 10.30699/ijp.2020. 127517.2390.